

Uusia menetelmiä työpaikkojen sisäilman laadun monitorointiin

(Työsuojelurahaston rahoittama hanke 116101)

Loppuraportti

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos ja Aerobiologian yksikkö

Päivi Koskinen ja Annika Saarto

2018



Turun yliopisto
University of Turku



Työsuojelurahasto
Arbetarskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

ISBN 978-951-29-7133-6 (Nid.)

ISBN 978-951-29-7134-3 (PDF)

Grano Oy – Turku, Suomi, 2018

Sisällys

JOHDANTO.....	4
Sisäilman huono laatu on merkittävä terveydellinen ja kansantaloudellinen ongelma	4
Biomonitoroinnin avulla tunnistetaan pienetkin pitoisuudet.....	4
Sukkulamatojen aistinvaraista käyttäytymistä on mahdollista hyödyntää sisäilmatutkimuksissa.....	5
TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	5
TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT	6
Aineisto	6
Altisteet	7
Nestealtistukset.....	8
Ilma-altistukset	8
Mikroskopia.....	8
Kemotaksiakokeet.....	8
Kammiokokeet	9
TULOKSET	9
Uutteet kosteusvauriohomeista	9
Nestepisarat.....	10
Pölyuutteet.....	11
Homeiden ja rakennusmateriaalien tuottamat haihtuvat yhdisteet.....	11
Kammiokokeet	12
Fluoresenssivasteen normalisointi	12
Johtopäätökset ja hankkeen tulevaisuuden suunnitelmat.....	13
TUTKIMUSRYHMÄ JA YHTEISTYÖKUMPPANIT.....	16
Tutkimusryhmä	16
Tutkimusyhteistyö	16
JULKAISUTOIMINTA	17
VIITTEET.....	18

JOHDANTO

Sisäilman huono laatu on merkittävä terveydellinen ja kansantaloudellinen ongelma

Koulujen, toimistojen ja muiden työpaikkojen sisäilmaongelmat ovat jatkuvasti esillä julkisuudessa. Työterveyslaitoksen tilastojen (www.ttl.fi) mukaan työperäistä astmaa ja muita allergisia hengityselinsairauksia todettiin tai epäiltiin vuonna 2013 yhteensä 882 tapausta. Niistä 40 % eli 357 tapausta kirjattiin homesienten aiheuttamiksi eli ne ovat merkittävä syy työpaikoilla yhä jatkuviin sisäilmaongelmiin. Homeiden ja muiden mikrobien lisäksi näitä ongelmia voivat kosteusvaurioituneissa tiloissa aiheuttaa siivotessa tai materiaalien hajotessa vapautuvat yhdisteet, kuten muovimattojen pehmittiminä käytettyjen ftalaattien hajoamistuotteet, joten työntekijöiden oireet voivat olla monien altistavien tekijöiden yhteisvaikutusta.

Sisäilmaongelmat aiheuttavat paitsi ammattitauteja, myös suuren määrän sairauspoissaoloja. Koska huonoa sisäilmaa ei poissaolon syynä tilastoida, ei sen osuutta poissaoloihin voida tarkkaan arvioida. Sisäilmaongelmat kuitenkin ilmenevät lisääntyneinä hengitystieoireina sekä infektioina. Ne myös usein aiheuttavat oireilijoille ja koko työyhteisölle stressiä. Korjaustoimenpiteiden jälkeenkin on korjattuihin tiloihin palaavissa työntekijöissä usein havaittavissa skeptisyyttä ja jopa psykosomaattista oireilua. Olisikin tärkeää kyetä luotettavasti osoittamaan aiemmin oireilleille henkilöille, että korjauksilla on pystytty poistamaan oireilun syy.

Sekä ennen että jälkeen korjausten on sisäilmaongelmien lähteitä usein hankala tunnistaa tai paikallistaa. Siksi tarvitaan aiempaa tehokkaampia ja luotettavampia menetelmiä haitallisten ympäristötekijöiden ja niiden aiheuttamien toksisten vasteiden monitorointia varten. Jos ja kun sisäilman haitallisia vaikutuksia osataan riittävän hyvin arvioida jo etukäteen, pystytään korjaavat toimenpiteet kohdistamaan oikein ja siten vähentämään vakavia altistuksia.

Biomonitoroinnin avulla tunnistetaan pienetkin pitoisuudet

Biomonitoroinnissa signaalien havaitsemiseen käytetään biomolekyylejä, elävää eliötä tai elion osia joko sellaisenaan (bio-indikaattorit) tai jonkin mittalaitteen osana (biosensorit) (biosanasto, www.btnk.fi). Biomonitoroinnin tavoitteena on tunnistaa toksiset ja muut oireita aiheuttavat yhdisteet samoilla tai pienemmillä pitoisuuksilla kuin mihin ihmisen aistit pystyvät, ja siten varoittaa vaaratekijöistä.

Kosteusvauriotilanteissa muodostuvien toksisten aineiden biomonitorointiin on kehitetty erilaisia bakteeri- tai eukaryoottisolujen kasvuun sekä sian siittiöiden liikkuvuuteen perustuvia menetelmiä (Toxtest 2010-2012, www.stm.fi). Ihmisen eri kudoksiin, kuten keuhkoihin tai hermostoon kohdistuvia haittavaikutuksia ei kuitenkaan täysin voi jäljitellä analysoimalla yksittäisistä soluista koostuvien populaatioiden vasteita. Aiempien pilottitutkimustemme lupaavien tulosten perusteella sukkulamadot voivat tähän tarjota muiden menetelmien rinnalle käyttökelpoisen ja aiempaa kokonaisvaltaisemman ratkaisun (Paavanen-Huhtala ym. 2017).

Sukkulamatojen aistinvaraista käyttäytymistä on mahdollista hyödyntää sisäilmatutkimuksissa

Sukkulamatojen soveltuvuudesta biomonitorointiin saatiin todisteita jo 1990-luvulla (Candido ja Jones, 1996), mutta vasta viime vuosina kehitetyt fluoresoivat reportterikannat ovat mahdollistaneet ympäristöperäisten näytteiden, kuten raskasmetallien vaikutusten laajamittaisemman analysoinnin (Anbalagan ym. 2012). Sisäilmaongelmien monitorointiin niitä ei kuitenkaan ole aiemmin käytetty, vaikka ne kokonaisina organismeina voisivat siihen soveltua soluviljelmiä paremmin. Sukkulamadot aistivat karkottavina aineina monia ihmistenkin ikäviksi haistamia yhdisteitä (Bargmann ym. 1993), ja voivat siten tarjota uudenlaisen innovaation mikrobien sisäilmaan tuottamien haihtuvien orgaanisten aineiden (mVOC = microbial volatile organic compounds; Korpi ym. 2009) sekä muiden sisäilman haitallisten kemiallisten yhdisteiden havainnointiin.

Sukkulamadoista yleisin laboratorioissa käytetty laji on *Caenorhabditis elegans*, joka on noin millimetrin mittainen läpikuultava maaperäeliö (www.wormbase.org). Se viihtyy monenlaisessa maaperässä, kunhan kosteutta ja lämpöä on riittävästi, ja käyttää maaperän mikrobeja ravinnokseen. Tämä ihmiselle harmiton laji on osoittautunut käteväksi geneettisen ja fysiologisen tutkimuksen malliorganismiksi, joka pystyy monipuolisesti aistimaan ympäristöään. Sillä on hyvin kehittynyt kemosensoinen hermosto, jonka solujen pinnalla olevat sadat erilaiset kemoreseptorit tunnistavat haihtuvia hajuja tai vesiliukoisia makuja (Bargmann 2006). Näin sukkulamato pystyy löytämään ravintonsa, välttämään sille vaarallisia pieneliöitä ja jopa vaipumaan horrokseen, jos olosuhteet eivät ole suotuisat. Sen haju- ja makureseptorien toimintaa sekä niiden välittämien aistimusten integraatiota voidaan tutkia mm. kemotaksiakokein, joissa mitataan sukkulamatojen liikkeitä erilaisia haihtuvia tai kasvualustaan imeytyviä aineita kohti (houkuttelevat aineet) tai niistä pois päin (karkottavat aineet). Lisäksi sukkulamatoja voidaan kasvattaa rinnakkain terveyshaitallisten mikrobien kanssa ja seurata mikrobien erittämien hajuaineiden vaikutuksia sukkulamatojen käyttäytymiseen, lisääntymiseen ja kuolleisuuteen (Popova ym. 2012). Sukkulamadot ovat kaksineuvoisia, kehittyvät nopeasti ja saavuttavat sukukypsyyden jo muutaman päivän ikäisinä, joten niitä voidaan laboratorio-olosuhteissa helposti ja edullisesti kasvattaa suuriakin määriä.

TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämä Työsuojelurahaston rahoittama tutkimusprojekti koostui kahdesta osasta, erikseen raportoidusta pilottihankkeesta (6/2015 – 6/2016) sekä sitä välittömästi seuranneesta jatkohankkeesta (7/2016 – 1/2018). Projektin tavoitteena oli kehittää ja testata biomonitorointiin soveltuvia toksisuustestejä sekä laboratorio- että kenttäkäyttöön. Työhypoteesimme mukaan sukkulamatojen kaltaisten kokonaisten organismien vasteiden selvittäminen tarjoaa mahdollisuuden arvioida sisäilman laatua ja ennustaa sen terveydellisiä vaikutuksia kokonaisvaltaisemmin kuin mikä on mahdollista määrittämällä vain yksittäisten mikrobien tai yhdisteiden määrää tai

laatua. Jos ja kun haittavaikutukset saadaan selkeästi havainnoitua, on myös helpompi jäljittää haitan aiheuttajia, ryhtyä tarvittaviin korjaustoimiin ja lopuksi tarkistaa kuinka hyvin korjaus on onnistunut. Pitkän tähtäimen tavoitteena onkin löytää uusia innovaatioita, joiden avulla työpaikoilla tapahtuvaa altistusta home- ja muille sisäilmaongelmille saadaan sekä mitattua että ennaltaehkäistyä.

Käytännön tavoitteena oli selvittää erilaisten stressiherkkiä reporttereita ilmentävien sukkulamatojen soveltuvuutta työpaikkojen sisäilman laadun monitorointiin. Tätä varten niiden vasteita sisäilman tai rakennusmateriaalinäytteiden sisältämille mykotoksiineille ja muille terveydelle haitallisille yhdisteille oli tarkoitus mitata mm. mikroskopian ja spektrometrian avulla. Erilaisia altisteita sekä altistus- ja analysointimenetelmiä oli myös tarkoitus verrata keskenään, jotta löydettäisiin selkeimmin sisäilmaongelmia indikoivia altisteita sekä niitä tunnistavia menetelmiä.

Haitallisten altisteiden vaikutuksia oli tarkoitus tutkia seuraavassa järjestyksessä:

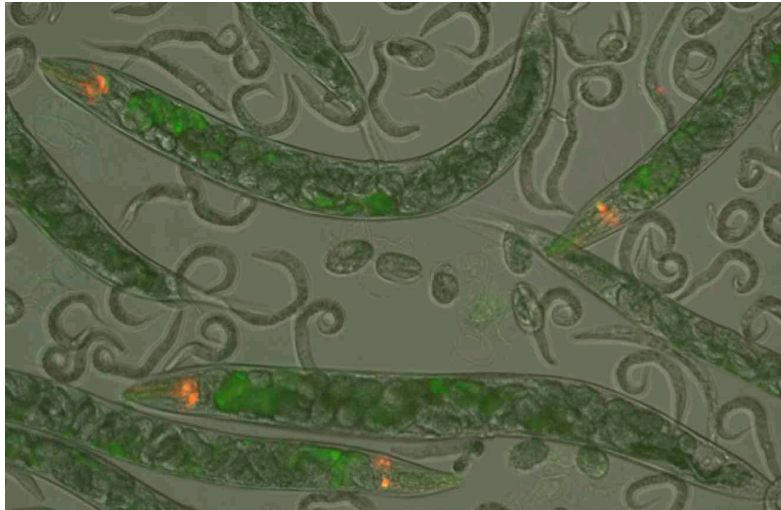
- 1) Sukkulamatojen altistukset puhtaille hajui- tai makuaineille riittävän isoilla pitoisuuksilla, jotta jatkotutkimuksiin voidaan valita sopivimmat reportterikannat
- 2) Altistukset tunnetuille kosteusvaurioita indikoiville mikrobeille tai niiden tuotteille
- 3) Altistusaikojen ja –pitoisuuksien titraukset, jotta saadaan selville fluoresoivan vasteen aiheuttavat raja-arvot erityyppisillä altisteilla
- 4) Altistukset mikrobeille ja/tai kosteusvaurioituneille rakennusmateriaaleille olosuhteiltaan säädellyissä kammioissa
- 5) Kenttäkokeet, joissa sukkulamatoja altistetaan suoraan sisäilmaongelmaisten tilojen tuottamille toksisille yhdisteille

TUTKIMUSAINIESTO JA MENETELMÄT

Aineisto

Tutkimuksissamme olemme käyttäneet transgeenisia sukkulamatoja, joita olemme saaneet yhteistyökumppaneiltamme sekä Caenorhabditis Genetics Center-instituutista, jonne tutkijat eri puolilta maailmaa voivat tallentaa sukkulamatojaan ja josta muut tutkijat niitä voivat tilata. Käyttämämme kannat ilmentävät eri stressitekijöille herkkien säätely-alueiden ohjaamina vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP = green fluorescent protein).

Tutkimushankkeen pilottivaiheessa käytössämme oli yhdeksän eri reportterikantaa, joiden avulla voitiin mitata haitallisten ympäristötekijöiden aiheuttamia proteiinien konformaation muutoksia sekä muita stressireaktioita, sillä tällaiset muutokset aktivoivat mm. lämpöshokkiproteiinien (HSP = heat shock protein) perheeseen kuuluvien geenien ilmenemistä solujen eri osissa sekä eri kudoksissa eri puolilla sukkulamatojen elimistöä. Jotta vihreän fluoresenssin induktio voitaisiin normalisoida, risteytimme kaikki kannat myös punaista fluoresoivaa proteiinia (RFP = red fluorescent protein) pään alueen hermostossa konstitutiivisesti tuottavan PY2417 kannan kanssa (**Kuva 1**).



Kuva 1. Nuoria aikuisia sukkulamatoja, jotka tuottavat punaista RFP-fluoresenssia, jonka määrä ei muutu, sekä vihreää GFP-fluoresenssia, jonka määrä kasvaa sukkulamatojen stressaantuessa. Samaan kuvaan on yhdistetty kirkasvalolla ja fluoresenssikanavilla otetut mikroskooppikuvat. Kuvassa pienempinä näkyvissä toukissa ja pyöreissä munissa ei fluoresenssia vielä ilmene.

Sukkulamatoja kasvatettiin niille optimaalisissa olosuhteissa OP-50-kannan kolibakteereilla päällystetyillä agarmaljoilla (Bargmann ym. 1993). Kokeita varten sukkulamadot synkronisoitiin kloorivalkaisukäsittelyllä, jotta eri aikoina suoritettuihin kokeisiin saatiin aina samanikäisiä, nuoria aikuisia sisältäviä populaatioita.

Altisteet

Sukkulamatoja altistettiin sisäilmaongelmista kärsivistä rakennuksista kerätyille mikrobeille ja niiden tuottamille toksineille käyttäen seuraavanlaisia näytteitä:

- Aerobiologian yksikön sisäilmaongelmaisista rakennuksista määrittämiä mikrobeja, joita oli kasvatettu sopivilla elatusmaljoilla, jotka valikoivasti tukivat homesienien tai sädesienibakteerien eli aktinomykeettien kasvua
- Mikrobeista eristämämme uutteita, joita varten mikrobirihmastoja oli suspensoitu 10 mg/200 µl vettä tai etanolia ja kuumennettu 10 min eri lämpötiloissa (RT, 50°C, 100°C), jolloin korkeammassa lämpötiloissa mikrobit itse kuolivat, mutta niiden tuottamat toksiinit yleensä silti säilyttivät myrkyllisyytensä
- Mikrobien kasvuympäristönsä erittämiä nestepisaroita (eksudaatit), joita olimme pipetoimalla keränneet mikrobirihmastojen päältä
- Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitokselta saatuja homeuutteita tai eksudaatteja, joiden toksiinipitoisuudet oli jo aiemmin määritetty (Andersson ym. 2016)
- Puhtaita mikrobitorksiineja
- Aerobiologian yksikön saamia rakennusmateriaalinäytteitä homehtuneista sahanpuruista ja kosteusvaurioituneista muovimatoista

Nestealtistukset

Sukkulamatoja siirrettiin nestekasvatukseen 96-kuoppalevyille, joiden pohjat olivat optisesti läpäiseviä. Kontrollikuoppiin pipetoitiin pelkkää puskuria. Kuoppiin lisättiin eri pitoisuuksissa joko altisteita tai niiden liuotusaineita. Osasta altisteita valmistettiin myös laimennossarjoja. Näytteitä inkuboitiin vuorokauden ajan. Näytteiden tuottaman GFP- ja/tai RFP-fluoresenssin intensiteetti mitattiin spektrometrisesti altistuksen alussa ja lopussa (Envision) tai sitä mitattiin eri aikapisteistä koko altistuksen ajan (Hidex Sense). Altisteiden itsensä tuottaman fluoresenssin määrä vähennettiin sukkulamatoja sisältäneiden näytteiden tuloksista. Stabiilin RFP-fluoresenssin määrää käytettiin normalisoimaan indusoituvan GFP-fluoresenssin määrää. Tulokset analysoitiin tilastollisen analyysin ohjelmilla (Excel).

Ilma-altistukset

Haihtuvia yhdisteitä tuottavien mikrobinäytteiden analysointiin käytettiin kaksiosaisia petrimaljoja, joiden toisella puoliskolla kasvatettiin tutkittavia mikrobeja ja toisella sukkulamatoja, jolloin niiden käyttäytymistä, lisääntymistä ja kuolleisuutta voitiin seurata vasteena ilman kautta välittyvien aineiden vaikutuksille. Kumpaakin osapuolta kasvatettiin niille optimaalisilla ravintoalustoilla. Myös rakennusmateriaalinäytteistä haihtuvien aineiden vaikutuksia tutkittiin tällä menetelmällä. 1-3 vrk altistuksen jälkeen sukkulamadot huuhdeltiin maljoilta puskuriin ja niiden tuottama fluoresenssi analysoitiin spektrometrian ja/tai mikroskopian avulla.

Mikroskopia

Eri tavoin altistetuista sukkulamadoista otettiin objektilaseille näytteitä, joita tarkasteltiin valomikroskoopilla (Olympus CK40 tai Leitz Fluvert FS), fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss Axiovert M200) tai Zoe-kuvantamislaitteella (Bio-Rad). Jälkimmäisellä otettiin kuvia myös sukkulamato-populaatioista, joita oli kasvatettu optisesti läpäisevillä 96-kuoppalevyillä. Fluoresenssin intensiteetti mitattiin mikroskooppiin liitetyllä digitaalikameralla otetuista kuvista ImageJ-kuvantamisohjelmalla. Tulokset analysoitiin tilastollisen analyysin ohjelmilla (Excel).

Kemotaksiakokeet

Kemotaksiakokeilla testattiin, lähtevätkö sukkulamadot kohti näytepisaraa vai pois päin siitä. Sukkulamatoja sijoitettiin kokeita varten agarmaljan keskelle ilman ravintobakteereita. Maljan toiselle puolelle laitettiin pisara liuotainainetta (esim. etanoli) ja toiselle puolelle houkuttelevaa tai karkottavaa hajuainetta liuottimeen laimennettuna. Puolen tunnin inkubaation jälkeen sukkulamatojen määrät laskettiin eri puoliskoilta. Näiden määrien pohjalta määritettiin kemotaktinen indeksi, joka on positiivinen houkutteleville aineille (max +1) ja negatiivinen (max -1) karkottaville aineille.

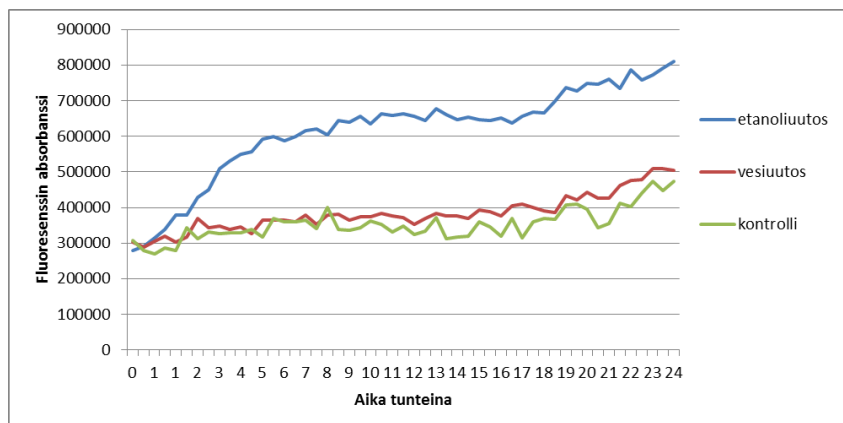
Kammiokokeet

VOC-yhdisteitä tuottavien rakennusmateriaalien vaikutusten analysoimiseksi kasvatimme sukkulamatoja kosteusvaurioituneiden materiaalien kanssa tiiviissä lasikammioissa, joiden lämpötilaa, ilmanvaihtoa ja suhteellista kosteutta voitiin säädellä. Kammiokasvatuksen etuna arveltiin olevan, että voisimme samalla kertaa määrittää sekä erittyvien toksien määrää että niiden aiheuttamia vasteita. Pilottikokeisiin lähtömateriaaliksi otettiin kosteusvaurioituneen muovimaton paloja, joita sijoitettiin kammioihin yhdessä sukkulamatoja sisältävien kasvatusaljien kanssa. 3 vrk mittaisen altistuksen päätteeksi kammioiden ilmasta otettiin näytteet, joista määritettiin VOC-pitoisuudet Työterveyslaitoksella. Kammioiden kasvatetut sukkulamadot puolestaan huuhdeltiin maljoilta puskuriin niiden tuottaman fluoresenssin spektrometrillä määrittämistä varten.

TULOKSET

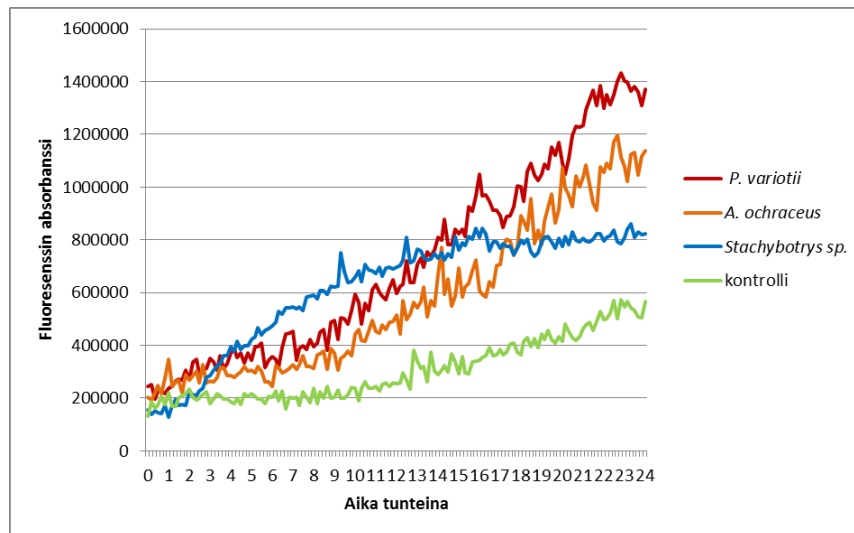
Uutteet kosteusvauriohomeista

Veteen tai etanoliin uutetuista homenäytteistä saimme talteen sekä vesi- että rasvaliukoisia toksineja. Sukkulamatojen nestekasvatuskokeissa ilmeni, että etanoliin uutetut homenäytteet (esim. *Stachybotrys*) aiheuttivat yleensä merkittävästi voimakkaammat vasteet kuin vesiuutteet, joiden vaikutukset eivät useinkaan poikenneet altistamattomista kontrollinäytteistä (**Kuva 2**). Käsittelypuskuriin lisätyn etanolin ei havaittu aiheuttavan vesikontrollista poikkeavaa reaktiota. Kun fluoresenssin absorbanssia mitattiin spektrometrisesti kaksi kertaa tunnissa vuorokauden ajan, lisääntyi fluoresenssi myös käsittelemättömissä kontrollikuopissa, mikä saattoi johtua siitä, että nestekasvatus ilman ravintoa jo sinänsä jonkin verran stressasi sukkulamatoja.

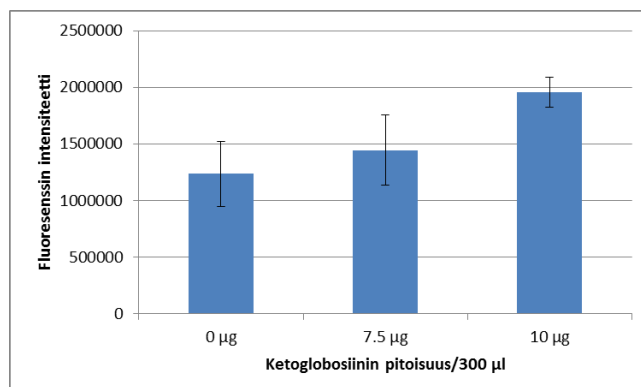


Kuva 2. *Stachybotrys*-uutteiden vaikutukset sukkulamatojen fluoresenssiin. Etanoliin uutetut homenäytteet aiheuttivat merkittävästi vahvemmat vasteet kuin vesiuutteet.

Kun kolmen eri homelajin uutetta verrattiin keskenään (**Kuva 3**), *Stachybotrys*-uute sai nopeimmin aikaan fluoresenssin lisääntymisen, saavuttaen maksimaalisen vasteen jo puolessa vuorokaudessa. Myös *Paecilomyces variotii* ja *Aspergillus ochraceus* -uutteet aiheuttivat voimakkaat vasteet, jotka kuitenkin kehittyivät hitaammin.



Kuva 3. Homeuutteen vaikutus sukkulamatoihin. Eri homelajit aiheuttivat voimakkaat vasteet sukkulamadoissa, mutta eri nopeuksilla.



Kuva 4. *Penicillium expansum* (P61) -eksudaatin vaikutus sukkulamatoihin. Fluoresoivista sukkulamadoista otetut mikroskooppikuvat analysoitiin ImageJ:llä. Mitä enemmän näyte sisälsi ketoglobosiinia, sitä enemmän sukkulamadot fluoresoivat. Kuvassa on esitetty keskiarvot ja keskihajonta kolmesta rinnakkaisesta näytteestä.

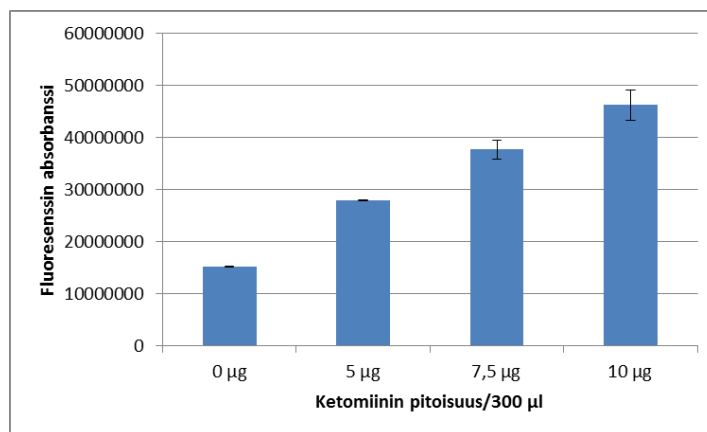
Nestepisarot

Monien kosteusvaurioihin liitettyjen mikrobien on osoitettu tuottavan kasvuympäristöönsä nestepisaroita (eksudaatteja), joihin ne voivat erittää toksineja, joiden pitoisuudet voivat olla jopa suuremmat kuin varsinaisessa mikrobimassassa (Salo ym. 2015; Andersson ym. 2016). Kun altistimme sukkulamatoja *Penicillium expansum*in (kanta P61) tuottamalle nesteelle, jonka on aiemmin osoitettu sisältävän mm. ketoglobosiini C:tä (Andersson ym. 2016), havaitsimme sen saavan

nestekasvatuksessa altistetut sukkulamadot fluoresoimaan normaalia enemmän jos sängen pienillä toksiinipitoisuuksilla (**kuva 4**). Osa nestepisaroista fluoresoi itsekseenkin, mikä huomioitiin spektrometrian kontrollinäytteissä. Mikroskopialla autofluoresenssi sen sijaan ei häirinnyt.

Pölyuutteet

Testasimme myös rakennuspölynäytteistä eristettyjä *Chaetomium*-homekantoja (mm. ABCD ja OT/7), joiden on aiemmin osoitettu tuottavan useita eri toksiineja, kuten ketoglobosiinia (ABCD), ketomiinia (OT/7) ja ketoviridiineja (molemmat) sekä olevan sytotoksisia sian siittiöillä tehdyissä kokeissa (Castagnoli ym. 2017). Myös omissa kokeissamme niiden etanoliuutteet aiheuttivat sukkulamadoille voimakkaan stressivasteen. ABCD-kannan vaikutusten luotettavaa spektrometrilla kvantitointia vaikeutti uutteen itsensä tuottama voimakas fluoresenssi, mutta OT/7 ei fluoresoinut, joten sen uutteilla saatiin selkeä annosvaste näytteiden ketomiinipitoisuuden suhteen (**kuva 5**).



Kuva 5. Ketomiinia sisältävän pölynäytteen vaikutus sukkulamatoihin. Mitä enemmän näyte sisälsi ketomiinia, sitä enemmän spektrometrisesti analysoidut sukkulamadot fluoresoivat.

Testasimme muitakin uutteita sekä eksudaatteja, joita oli kerätty kosteusvaurioituneista rakennuksista eristetyistä homeista ja joista osasta oli tunnistettu toksiineja. Vertailun vuoksi testasimme myös muutamia mikrobitoksiineja sellaisenaan. Eri ajankohtina ja eri sukkulamatokannoilla suoritettujen spektrometrinen testausten tuloksia voitiin verrata keskenään laskemalla altistusten alku- ja lopputilanteen absorbanseista fluoresoivien vasteiden kertaluokat.

Homeiden ja rakennusmateriaalien tuottamat haihtuvat yhdisteet

Kun kaksiosaisilla agarmaljoilla kasvatettuja sukkulamatoja altistettiin ilman välityksellä väliseinän toisella puolella kasvavien homeiden tuottamille haihtuville hajuaineille, saatiin vaihtelevampia tuloksia kuin nestekasvatuskokeissa. Esim. *Stachybotrys* sp., jonka uutteilla oli saatu erittäin vahva vaste (**Kuva 2**), aiheutti ilman välityksellä hieman lievemmän, mutta silti selkeästi spektrometrian tai mikroskopian avulla mitattavan vasteen. Negatiivisena kontrollinamme oli *Geotrichum candidum*, joka on niin maaperässä kuin ihmisen mikrobiomissa normaalisti esiintyvä homesieni,

ja jonka sukkulamadotkin havaitsivat harmittomaksi. *S. californicus* -aktinomykeetti sai näissä mittauksissa aikaan vain vähäisen vasteen, vaikka sillä oli vastaavissa kokeissa pilottihankkeemme aikana havaittu merkittäviä vaikutuksia (Paavanen-Huhtala ym. 2017). Onkin todennäköistä, että samankaan mikrobilajin eri kasvatukset eivät joka kerta tuota yhtä paljoa toksisia tai muutoin haitallisiksi koettavia hajuaineita.

Homeiden ja aktinomykeettien lisäksi testasimme ilmajälitteisiä vasteita myös kosteusvaurioituneista rakennuksista kerätyistä sahanpuru- ja muovimattonäytteistä. Niistäkin monet aiheuttivat eri sukkulamatojain kannoilla testattuina kontrollipuruja tai -mattoja voimakkaammat fluoresoivat vasteet.

Kammiokokeet

Halusimme tarkemmin selvittää, että millaisia haihtuvia yhdisteitä kostuneista muovimatoista ilmaan irtoaa ja miten ne vaikuttavat sukkulamatoihin. Tätä varten sukkulamatoja inkuboitiin ilmatiiviissä kammioissa 3 vrk niin että osassa oli mukana kostunut mattonäyte. Koejaksojen päätteeksi kammioista otettiin ilmanäytteet, joista määritettiin haihtuvat orgaaniset yhdisteet (VOC-analyysi). Analyysitulosten perusteella haihtuvien orgaanisten yhdisteiden kokonaispitoisuus (TVOC) ylitti Työterveyslaitoksen (www.ttl.fi) huoneilmalle määrittämän $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ viitearvon kaikissa kammioissa. Kammioissa kasvatetuista sukkulamadoista yritettiin määrittää fluoresoivat vasteet, mutta valitettavasti niiden lukumäärät alittivat spektrometriaan vaadittavan minimimäärän. Kammiopohjaisen koesysteemin rakentaminen ja varsinkin VOC-yhdisteiden analysointi oli sen verran kallista, ettei koetta enää pystytty uusimaan, vaikka se selvästi olisi tarvinnut lisäoptimointia.

Fluoresenssivasteen normalisointi

Sekä indusoituvaa GFP-fluoresenssia että stabiilia RFP-fluoresenssia ilmentävien sukkulamatojen tuottamia GFP-vasteita oli jatkohankkeen aikana tarkoitus normalisoida RFP-fluoresenssin avulla. Mikroskooppikuvia tarkasteltaessa kuitenkin havaittiin, ettei RFP-fluoresenssia voinutkaan luotettavasti käyttää spektrometristen GFP-tulosten normalisointiin. Vahva RFP-signaali nimittäin näkyi jonkin verran myös GFP-kanavalla eli näiden fluoroforien spektrit osuivat osin päällekkäin. Määrällisesti sillä ei silti ollut merkittävää vaikutusta GFP-fluoresenssin määrään. Koska spektrometrisissa mittauksissa fluoresenssin lähtötaso ennen altistuksia oli saman määrän sukkulamatoja sisältävissä eri näytteissä samaa luokkaa, totesimme ettei RFP-pohjainen normalisointi välttämättä olisi tarpeen. Näistä syystä tässä raportissa esitetyissä tuloksissa on otettu huomioon pelkästään GFP-fluoresenssin määrä, vaikka osa kokeista suoritettiin GFP/RFP-tuplasiivisilla kannoilla.

Johtopäätökset ja hankkeen tulevaisuuden suunnitelmat

Tämän tutkimushankkeen aikana pyrimme optimoimaan pilottihankkeessa kehittämiämme eri menetelmiä. Tässä tavoitteessa enimmäkseen onnistuttiin, sillä saimme varmistettua, että eri altistus- ja mittausten menetelmät teknisesti toimivat. Onnistuimme myös osoittamaan, että mikroskopia- ja spektrometriamenetelmät tukevat toisiaan eli että näillä menetelmillä saadaan luotettavasti samansuuntaisia tuloksia. Spektrometria on menetelmänä vaivattomampi ja tuottaa annos- ja aikavasteista suoraan kvantitatiivista dataa, mutta mikroskopiolla on mahdollista paikantaa fluoresoiva vaste eri osiin sukkulamatoa, jolloin pystytään päättämään, että kohdistuuko toksisuus tasaisesti koko elimistöön vai spesifisemmin esim. suosiin, hermostoon tai suolistoon, joka on vastuussa sukkulamatojen alkeellisesta immuunipuolustusjärjestelmästä. Tämä voi tarjota selkeän edun verrattuna menetelmiin, joilla mitataan yksittäisistä bakteeri- tai eukaryoottisoluista koostuvien populaatioiden vasteita. Mikroskopia pystyy myös erottelemaan elävät yksilöt suoriksi jäykistyneistä kuolleista yksilöistä, jolloin on mahdollista kvantitoida altisteiden vaikutuksia sukkulamatojen liikkuvuuteen ja elinkykyyn sekä erottaa subletaalit vasteet letaaleista. Lisäksi mikroskopiassa altisteiden itsensä tuottama fluoresenssi ei häiritse kvantitointia yhtä paljon kuin spektrometriassa, jossa autofluoresenssi on tarpeen vähentää lopputuloksista.

Voidaksemme normalisoida tuloksia sukkulamatojen määrän suhteen olimme risteyttäneet indusoituvaa GFP-fluoresenssia ilmentäviä kantoja RFP-fluoresenssia stabiilisti ilmentävän kannan kanssa. Tämä ei kuitenkaan ollut toimiva ratkaisu, sillä näiden kahden fluoroforin tuottamia signaaleja ei täysin kyetty erottelemaan toisistaan, vaan pään alueen hermostossa kahtena voimakkaana täplänä näkynyt RFP-signaali oli osin havaittavissa GFP-kanavallakin. Lisäksi kyljellään liikkuvien sukkulamatojen asennot ja elinkyky vaikuttivat siihen, oliko niissä näkyvissä yksi vai kaksi RFP-täplää.

Hidex-laitteella suoritettujen spektrometrinen mittaukset osoittivat, ettei RFP-normalisaatio itse asiassa ollut tarpeen, sillä mikäli sukkulamatoja oli onnistuttu pipetoimaan yhtä suuret määrät kuhunkin 96-kuoppalevyn kuoppaan, olivat fluoresenssin lähtötasot kaikissa sangen samankaltaiset. Eri koesarjojen välillä sen sijaan havaittiin eroja, mikä teki hankalammaksi verrata eri kerroilla käytettyjen altisteiden eri sukkulamatoille aiheuttamia vasteita keskenään. Hidex-laitteella oli kuitenkin kätevää seurata vasteen kehittymistä ajan funktiona, joten vertailevaa kvantitointia varten on mahdollista laskea joko altistuksen alku- ja lopputilanteen absorbanssin suhteellisia kertoimia tai fluoresenssin voimistumisen kulmakertoimia. Envision-spektrometrillä suoritettujen mittaukset osoittivat, ettei tulosten luentaan sinänsä tarvita mitään erityislaitteita, vaan siihen soveltuu mikä tahansa fluoresenssia mittaava kuoppalevylukija, jolloin tulos voidaan ilmoittaa fluoresenssin suhteellisen lisääntymisen kertoimena lähtötilanteeseen verrattuna.

Tutkimuksissa havaitsimme, että altistus ihmiselle haitallisille mikrobeille tai niiden tuottamille toksineille aiheuttaa sukkulamatoille selkeästi mitattavan fluoresoivan vasteen, jollaista kontrolleina käytetyt vaarattomat mikrobit tai puhtaat

rakennusmateriaalit eivät saaneet aikaan. Menetelmillämme on siis mahdollista erottaa ihmisen terveydelle haitallisia altisteita haitattomista. Altisteiden sukkulamadoissa aiheuttamat vasteet voidaan myös luokitella esim. voimakkaasti positiivisiin, jonkin verran positiivisiin, vähäisesti tai vaihtelevasti positiivisiin ja selkeästi negatiivisiin. Erityyppisten altisteiden aiheuttamissa vasteissa on kuitenkin merkittäviä, osin menetelmäkohtaisia eroja.

Erilaisiin uutteisiin sukkulamadot reagoivat kaikkein selkeimmin. Ihmiselle vaarattoman *Geotrichum candidum* -homeen uutteilla ei ollut vaikutusta, mutta kosteusvaurioihin ja sisäilmaongelmiin yhdistetyt mikrobit, kuten *Stachybotrys*, *Aspergillus ochraceus* ja *Paecilomyces variotii* aiheuttivat voimakkaasti fluoresoivat vasteet. Käytetyillä pitoisuuksilla *Stachybotrys*-uutteet olivat sukkulamadoille suorastaan letaaleja, muut subletaaleja. Etanoliin uutetut home- tai pölynäytteet aiheuttivat sukkulamadoilla vahvemmat vasteet kuin vesiuutteet. Etanoliin uutuvien rasvaliukoisten toksiinien onkin osoitettu olevan terveydelle haitallisempia, koska ne pääsevät solukalvon lävitse (Salkinoja-Salonen 2016). Myös joidenkin homeiden tuottamat nestepisarat olivat sukkulamadoille toksisia vahvasti laimennettuinakin. Rasvaliukoisia toksineja sisältävät pisarat voivat levitä sisäilman vesihöyryn mukana, ja siten joutua hengitysteihin ja aiheuttaa terveysongelmia.

Kaksiosaisilla maljoilla kasvatetut sukkulamadot reagoivat väliseinän takana mutta samassa ilmatilassa kasvaneisiin homeisiin tai aktinomykkeetteihin vaihtelevammin kuin mikrobiuutteisiin. Mikrobin alkuperä ja se kuinka kauan sitä oli kasvatettu puhdasviljelmänä suotuisissa olosuhteissa, saattoi vaikuttaa niin näihin kuin osin muihinkin tuloksiimme. Kun mikrobi ei joudu kilpailemaan muiden lajien kanssa, sen ei myöskään tarvitse tuottaa muita lajeja karkottavia toksineja niin paljon kuin monia eri lajeja sisältävässä, mahdollisesti fysikaalisesti epäsuotuisassa kasvuympäristössä. Voisikin arvella, että etenkin ilmajälitteisten vasteiden mittaustulokset kuvastavat mikrobiviljelmän senhetkistä eli akuuttia tilannetta, kun taas pöly- ym. uutteista mitatut nestevälitteiset vasteet voivat ilmentää pitkäaikaisempaa eli kroonista toksisten aineiden keräytymistä. Toisaalta on hyvä pitää mielessä, että toksiinien vaarallisuus riippuu paljon niiden altistusreitistä. Hengityselimiin saatuna sama aine voi olla ihmiselle jopa 100 kertaa vaarallisempi kuin suun kautta nautittuna (REACH-CLP asetus, Euroopan unioni, 52872012; Salkinoja-Salonen 2016), joten sikäli vaatimattomakin ilmajälitteiset vasteet voivat olla merkittäviä.

Kaksiosaisilla maljoilla suoritettavat kokeet osoittivat myös kosteusvaurioituneista sahanpuru- tai muovimattonäytteistä erittyvän ilman kautta välittyviä hajuaineita, jotka saavat sukkulamadoissa aikaiseksi fluoresoivan vasteen. Ilmatiiviissä kammioissa suoritetuilla kokeilla pyrittiin määrittämään samalla kertaa sekä kosteusvaurioituneista matonpaloista erittyvät haihtuvat aineet että niiden sukkulamadoille aiheuttamat toksiset vasteet. Sukkulamatojen liian vähäisen määrän takia jälkimmäinen tavoite jäi saavuttamatta, mutta VOC-analyysit osoittivat kostuneista muovimatoista erittyvän Työterveyslaitoksen (www.ttl.fi) huoneilmalle määrittämät viitearvot merkittävästi ylittäviä määriä erilaisia haihtuvia aineita.

Tutkimushankkeessa noudatimme enimmäkseen alkuperäissuunnitelmiamme siitä, miten ja missä järjestyksessä mitata eri haitallisten altisteiden vaikutuksia, mutta aikataulullisista ja teknisistä syistä johtuen ihan kaikkea ei kuitenkaan ehditty kokeilla:

1) Sukkulamatojen alustavien altistusten pohjalta jatkotutkimuksiin pystyttiin valitsemaan sopivimmat reportterikannat, joilla saatiin toistettavia ja toisiaan tukevia tuloksia. Näillä kannoilla näkyi jonkin verran fluoresenssia jo kontrolliolosuhteissa, mutta altistusten seurauksena se lisääntyi molemmilla kannoilla merkittävästi ja mitattavissa määrin.

2) Altistukset tunnetuille kosteusvaurioita indikoiville mikrobeille tai niiden tuotteille aiheuttivat yleensä fluoresoivan vasteen, joka oli kvantitoitavissa spektrometrian ja/tai mikroskopian avulla, kun taas vaarattomat mikrobit eivät vastetta saaneet aikaan.

3) Altistusaikojen titraus osoitti 24 h seurannan soveltuvan useimpiin kokeisiin. Altistuspitoisuuksiakin titrattiin, mutta fluoresoivan vasteen aiheuttavia raja-arvoja ei erityyppisillä altisteilla ehditty riittävällä tarkkuudella määrittää. Enimmäkseen käytettyjen altisteiden pitoisuudet olivat subletaaleja eli stressasivat sukkulamatoja, mutta eivät tappaneet niitä.

4) Altistus kosteusvaurioituneille rakennusmateriaaleille olosuhteiltaan säädelyissä kammioissa onnistui teknisesti siltä osin, että materiaalien erittämät haihtuvat aineet saatiin määritettyä, mutta sukkulamatojen alhainen määrä ei mahdollistanut vasteiden kvantitaatiota. VOC-analyysien kalliin hinnan takia koetta ei ollut mahdollista toistaa. Sen sijaan kaksiosaisilla maljoilla vastaavien rakennusmateriaalien tuottamien haihtuvien aineiden vasteita onnistuttiin mittaamaan riittävillä sukkulamatomäärillä.

5) Suunniteltuja kenttäkokeita, joissa sukkulamatoja altistettaisiin suoraan sisäilmaongelmaisten tilojen tuottamille toksisille yhdisteille, ei tässä vaiheessa vielä ollut perusteltua aloittaa.

Tämän hankkeen aikana saadut tulokset tukevat alkuperäistä työhypoteesiamme, jonka mukaan sukkulamatojen kaltaisten kokonaisten organismien vasteiden selvittäminen tarjoaa mahdollisuuden arvioida sisäilman laatua ja ennustaa sen terveydellisiä vaikutuksia kokonaisvaltaisemmin kuin mikä on mahdollista määrittämällä vain yksittäisten mikrobien tai yhdisteiden määrää tai laatua. Näytteiden kokonaistoksisuuden lisäksi sukkulamadoilla voidaan saada ainakin suuntaa antavaa tietoa siitä, mihin elimistön osiin erityyppisten altisteiden haittavaikutukset voivat kohdistua. Lisäksi on mahdollista mitata sukkulamatojen liikkuvuutta, lisääntyvyyttä ja elinkykyä. Jos ja kun sisäilman haitalliset vaikutukset saadaan selkeästi havainnoitua, on myös helpompi jäljittää haitan aiheuttajia ja saada ne kuriin tilanteeseen sopivilla toimenpiteillä, kuten korjausrakentamisella, ilmanvaihdon tehostamisella tai siivouskäytäntöjen muutoksella. Näin pystytään vähentämään vakavia altistuksia sekä muutosten jälkeen uusintatestien avulla osoittamaan rakennuksessa aiemmin oireilleille, että oireiden syyt on onnistuttu poistamaan.

Jatkotutkimuksissa sukkulamatopohjaisia menetelmiämme on tarkoitus systemaattisesti ja sokkoutetusti validoida verrattuna muihin käytössä tai kehitteillä oleviin testeihin. Tässä hankkeessa suoritettu alustava vertailu jo lupaavasti osoitti,

että nisäkässoluilla toksisiksi havaitut altisteet aiheuttavat sukkulamadoillakin selkeän stressivasteen. On kuitenkin tarpeen laajemmin kartoittaa, kuinka yleispäteviä menetelmämme ovat eli minkätyyppisten haitallisten ympäristötekijöiden biomonitorointiin ne parhaiten soveltuvat. Myös kvantitoinnille on tarpeen määrittää selkeät toksisuuskriteerit, esim. EC₅₀ (= effective concentration).

Hankkeessa oli mukana monipuolista asiantuntemusta sekä sukkulamatojen että sisäilmaongelmien osalta. Jatkossa yhteistyötä eri tahojen kanssa on tarkoitus laajentaa entisestään, jotta saamme tuotettua uutta arvokasta tietoa sisäilmaongelmien arvioinnin ja ennaltaehkäisyn tehostamiseksi.

Pitkän tähtäimen tavoitteenamme on fluoresoivien sukkulamatojen avulla kehittää biomonitorointiin soveltuvia toksisuustestejä sekä laboratorio- että mahdollisesti myös kenttäkäyttöön. Tällaisten testien tulisi olla riittävän herkkiä, tarkkoja ja helppokäyttöisiä sekä kohtuuhintoisia ottaa, säilyttää ja analysoida. Niillä tulisi myös pystyä luotettavasti erottelemaan vaurioituneet ja ihmisen terveydelle vaaralliset kohteet terveistä työympäristöistä.

TUTKIMUSRYHMÄ JA YHTEISTYÖKUMPPANIT

Tutkimushankkeen osapuolet eli tutkimusryhmän jäsenet sekä yhteistyökumppanit taspasivat säännöllisin väliajoin hankkeen aikana, keskustelivat tuloksista ja suunnittelivat yhdessä jatkotoimenpiteitä. Ulkopuoliselle ohjausryhmälle ei tutkimusten tässä vaiheessa vielä katsottu olevan tarvetta.

Tutkimusryhmä

Dos. Päivi Koskinen, yliopistonlehtori, Biologian laitos, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, johto, ohjaus ja raportointi, 1,5 kk, 7/2016 – 1/2018

FT Sari Paavanen-Huhtala, tutkija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Projektin käytännön toteutus ja raportointi, 19 kk, 7/2016 – 1/2018

PhD Karunambigai Kalichamy, tutkija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Apua projektin käytännön toteutukseen, 3,3 kk, 3-5/2017, 1/2018

Fil. yo. Joni Eklund, kesäharjoittelija, Biologian laitos, Turun yliopisto
Apua projektin käytännön toteutukseen, 2 kk, 7-8/2016

Tutkimusyhteistyö

FT Annika Saarto, Aerobiologian yksikön johtaja, yliopistontutkija, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu ja ohjaus, 0,5 kk, 7/2016 – 1/2018

FM Anna-Mari Pessi, erikoistutkija, Aerobiologian yksikkö, Turun yliopisto
Projektin suunnittelu, homesienien tunnistus, 0,5 kk, 7/2016 – 1/2018

FM Sirkku Häkkinen, mykologi, rakennusterveysasiantuntija, Aerobiologian yksikkö, Turun yliopisto

Projektin suunnittelu, homesienien tunnistus, 0,5 kk, 7/2016 – 1/2018

Laboratorioanalyttikko Oskari Talvitie, laboratoriomestari, Aerobiologian yksikkö, Turun yliopisto VOC-kammiokokeiden toteutus, 1 kk, 11-12/2016

FT Maria Andersson, tutkija, rakennustekniikan laitos, Aalto-yliopisto
Homeita, homeuutteita ja nestepisaroita projektin käyttöön, toksiinien määritykset

Emeritaprofessori Mirja Salkinoja-Salonen, mikrobiologi, Helsingin yliopisto
Asiantuntemusta sisäilmaongelmista ja niiden määrittämismenetelmistä

Dos. Carina Holmberg-Still, tutkimusjohtaja, Biomedicum Helsinki
Sukkulamatoasiantuntemusta sekä sukkulamatokantoja projektin käyttöön

Professori David de Pomerai, Nottinghamin yliopisto
Sukkulamatoasiantuntemusta sekä sukkulamatokantoja projektin käyttöön

JULKAISUTOIMINTA

Pilottihankkeen keskeisiä tuloksia on julkaistu vuoden 2017 Sisäilmastoseminaarissa julkaisussa (Paavanen-Huhtala ym. 2017) ja tämän jatkohankkeen aikana syntyneitä tuloksia tullaan esittelemään vuoden 2018 Sisäilmastoseminaarissa ja sen julkaisussa (Paavanen-Huhtala ym. 2018). Lisäksi Päivi Koskinen on luennoinut sukkulamatojen käytöstä sisäilma- ja muissa tutkimuksissa Turun yliopiston biologian, lääkekehityksen ja työtervestieteen opiskelijoille sekä Åbo Akademin biologian opiskelijoille.

Hankkeessa kehitetyistä menetelmistä on jätetty Turun yliopistolle keksintöilmoitus 5.9.2016, mutta sen käsittely on vielä kesken. Koska menetelmillä voi olla kaupallista käyttöä, edellyttää aineiston oikeudet omistava Turun yliopisto, että aineiston ja menetelmien yksityiskohtaista julkistamista siirretään, kunnes niiden hyödyntämismahdollisuudet on saatu arvioitua.

Tieteellinen julkaisu sopivassa kansainvälisessä alan lehdessä on suunnitteilla loppuraportissa esiteltyjen tulosten pohjalta, joita vielä tarvittaessa täydennetään. Tavoitteena on lähettää tulokset julkaistaviksi heti kun muut hyödyntämismahdollisuudet on saatu kartoitettua. Koska on odotettavissa, että hankkeemme tulokset herättävät yleistä mielenkiintoa, on niistä tarkoitus siinä vaiheessa tiedottaa laajemmin ja kansantajuusemmin myös suurelle yleisölle kotimaisissa julkaisusarjoissa ja/tai yleisötilaisuuksissa. Tiedottamisessa tullaan hyödyntämään niin Turun yliopiston kuin Työsuojelurahaston tiedotuskanavia.

VIITTEET

Anbalagan C, Lafayette I, Antoniu-Kourounioti M, Haque M, King J, Baillie J, Gurierrez C, Rodriguez Martin JA & De Pomerai D. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in soil pore water samples. *Ecotoxicology* 21, 439-455, 2012.

Andersson M., Aattela E., Mikkola R., Atosuo J., Lilius EM., Suominen E., Lehtinen S., Viljanen M. ja Salkinoja-Salonen M. (2016) Uusia sisäilman tutkimusmenetelmiä. Sisäilmastoseminaari, *SIY raportti* 34, 295-300, 2016.

Bargmann CI, Hartweg E & Horvitz HR. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515, 1993.

Bargmann CI. Chemosensation in *C. elegans*. *Wormbook 2006* (www.wormbook.org)

Candido EPM & Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *TIBTECH* 14, 125, 1996.

Castagnoli E, Andersson MA, Mikkola R, Kredics L, Marik T, Kurnitski J & Salonen H. Indoor Chaetomium-like isolates: resistance to chemicals, fluorescence and mycotoxin production. Sisäilmastoseminaari, *SIY raportti* 35, 227-232, 2017.

Korpi A, Järnberg J & Pasanen AL. Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol* 39, 139-193, 2009.

Paavanen-Huhtala S, Kalichamy K, Häkkinen S, Pessi AM, Saarto A & Koskinen P. Sukkulamadot sisäilmaongelmien bioindikaattoreina. Sisäilmastoseminaari, *SIY raportti* 35, 251-255, 2017.

Paavanen-Huhtala S, Kalichamy K, Pessi AM, Häkkinen S, Saarto A, Mikkola R, Andersson MA & Koskinen PJ. Mikrobin tuottamien toksien biomonitointi sukkulamatojen avulla. Sisäilmastoseminaari, *SIY raportti* 36, painossa, 2018.

Popova AA, Koksharova OA, Lipasova VA, Zaitseva JV, Katkova-Zhukotskaya OA, Eremina S, Mironov A, Chernin LS & Khmel IA. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected micro-organisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Res Int* 125704, 2014.

Salkinoja-Salonen M. Diagnostisia työkaluja rakennusten patologiaan. *Mikrobiologian julkaisu* 50, Helsingin yliopisto, 2016, 134 s.

Salo J, Andersson MA, Mikkola R, Kredics L, Viljanen M ja Salkinoja-Salonen M. Vapor as a carrier of toxicity in a health troubled building. *Proceedings of: Healthy Buildings 2015 – Europe*, Eindhoven, The Netherlands, May 2015, ID346, p. 8, 2015.