

MIKROBIYHTEISÖJEN MÄÄRITTÄMINEN RAKENNUSMATERIAALINÄYTTEISTÄ KÄYTTÄEN NGS- SEKVENSOINTIA

Martin Täubel, Maria Valkonen, Pauli Tuoresmäki, Katja Saarnio, Hanna Leppänen,
Asko Vepsäläinen, Pirkka Kirjavainen ja Anne Hyvärinen

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Ympäristöterveysyksikkö

TIIVISTELMÄ

NGS-sekvensointimenetelmiä (Next generation sequencing, NGS) käytetään jo laajasti mikrobiston kuvaamiseen niin ympäristö- kuin ihmisperäisistä näytteistä. Nämä menetelmät ovat mullistaneet ymmärrystämme mikrobiyhteisöjen ekologiasta ja dynamiikasta sekä näiden yhteydestä ihmisten terveyteen ja sairauksiin. SeRmI-tutkimuksessa oli mukana yli 400 rakennusmateriaalinäytettä, joista määritimme sienten ja bakteerien mikrobiomia käyttäen amplicon -sekvensointitekniikkaa. Tutkimuksessa mukana olevista näytteistä havaittiin eritasoista mikrobikasvua laimennossarjaviljelyyn perustuen. Tutkimuksen päätavoitteet olivat i) tunnistaa kosteusvaurioituneissa materiaaleissa esiintyviä mikrobeja; ja ii) arvioida NGS-menetelmän käyttöä etsittäessä mikrobikontaminaatiota rakennusmateriaalinäytteestä.

TAUSTA

NGS-sekvensointimenetelmien käyttö mikrobiökologisissä tutkimuksissa on viimeisten parin vuosikymmenen aikana helpottunut mm. sekvensointikustannusten nopean madaltumisen ja bioinformatiikan työkalujen parantuessa. Erityisesti bakteerien 16S rRNA- geenin ja sienten ITS -alueen amplicon-sekvensointia on käytetty ympäristö- ja ihmisperäisten näytteiden mikrobiyhteisöjen perusteelliseen tutkimukseen. SeRmi-tutkimuksessa hyödynsimme amplicon-sekvensointimenetelmää sienten ja bakteerien mikrobiyhteisöjen tutkimiseen rakennusmateriaalinäytteistä. Nämä menetelmät tarjoavat mahdollisuuden ymmärtää mikrobiyhteisöjen dynamiikkaa ja monimuotoisuutta uudella tasolla. Rakennetun ympäristön mikrobiston tutkimusten myötä on saatu käsitys sekä rakennusten mikrobiologiasta että myös jossain määrin siitä, kuinka nämä rakennetun ympäristön mikrobit vaikuttavat terveyteemme /1,2,3/. Amplicon-sekvensointi vaikuttaa myös lupaavalta menetelmältä mikrobiyhteisöjen muutoksen tutkimiseen tilanteissa, joissa esim. rakenteisiin on päässyt kosteutta /4,5,6/. NGS-sekvensointi saattaa olla hyödyllinen menetelmä i) tukemaan rakennusteknistä kuntotutkimusta kosteus- ja homevaurion osalta, ii) havaitsemaan rakennusten kosteuteen liittyviä tekijöitä, ja iii) kehittämään terveysvaikutusten arviointia mikrobialtistumisen osalta kosteusvaurioituneissa rakennuksissa. NGS-sekvensoinnin toimivuutta em. käyttötarkoituksiin tulee kuitenkin vielä arvioida /7/.

Aiempaa tutkimusta mikrobien kartoittamiseksi rakennusmateriaalinäytteistä NGS-menetelmällä ei ole juurikaan tehty. Tässä tutkimuksessa oli mukana yli 400 rakennusmateriaalinäytettä, joista oli viljelymenetelmällä havaittu eritasoista mikrobikasvua. Näytteistä määritettiin sienten ja bakteerien mikrobiomia käyttämällä NGS-tekniikkaa. Tavoitteenamme oli kuvata mikrobistoa vaurioituneissa

rakennusmateriaaleissa sekä arvioida NGS-menetelmän käytettävyyttä rakennusteknisen kuntotutkimuksen tukena.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Yhteensä 436 rakennusmateriaalinäytteestä analysoitiin asumisterveysasetuksen /8/ laimennossarjaviljelyn avulla elinkykyisten sienten ja bakteerien määrät. Näytteet punnittiin (1-5g) ja uutettiin laimennosliuokseen. Näyte viljeltiin laimennossarjana kahdelle sienielatusalustalle (M2 ja DG-18) ja yhdelle bakteerielatusalustalle (THG).

Samoista rakennusmateriaalinäytteistä käytettiin 200µl laimennosliuossuspensiota DNA-eristykseen. Ennen eristystä näytteet helmimyllytettiin ja eristys tehtiin käyttäen kaupallista Chemagic DNA Plant DNA-eristyskittiä (PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Germany) sekä KingFisher™ mL DNA eristysautomaattia (Thermo Fisher Scientific, Inc., Finland). Bakteerien 16S rRNA ja sienten ITS-alueen amplicon-sekvensointi tehtiin Illumina Miseq v3 -tekniikalla, kuten on aiemmin kuvattu Jayaprakash ym. /4/ julkaisussa. Tulosten bioinformatiikka-analysointiin käytettiin dada2 package -sovellusta (v 1.10.1) /9/, joka toteutettiin R ympäristössä. Bakteerien rRNA jasienten ITS amplicon-sekvenssivarianssin (ASV) taksonit määritettiin käyttäen SILVA taxonomic training data dada2 (Silva v 132) /10/ ja UNITE general FASTA release -sovelluksia. Kontaminaatiot sekvenssidatassa identifioitiin käyttämällä decontam package -sovellusta (v 1.1.2) /12/.

Tilastollisia analyyseja varten rakennusmateriaalinäytteet jaettiin vaurioituneisiin ja vaurioitumattomiin näytteisiin viljelyn perusteella. Bakteereille rajana käytettiin $\geq 100\ 000$ pmy/g materiaalia ja/tai aktinomykeettejä $\geq 3\ 000$ pmy/g materiaalia THG-elatusalustalla. Sienille rajana käytettiin $\geq 10\ 000$ pmy/g materiaalia DG18 tai M2 elatusalustalla. Chi-Square testiä käytettiin bakteerien ja sienten esiintymisen (0/1 data) vertailuun vaurioituneista vs. vaurioitumattomista näytteistä. ANCOM-analyysejä /9/ käytettiin tilastollisena työkaluna, jonka avulla pystyttiin määrittämään mikrobitalsonien suhteellisten osuuksien eroja näytteessä sen sijaan, että olisi määritetty pelkästään niiden esiintymistä/puuttumista näytteessä.

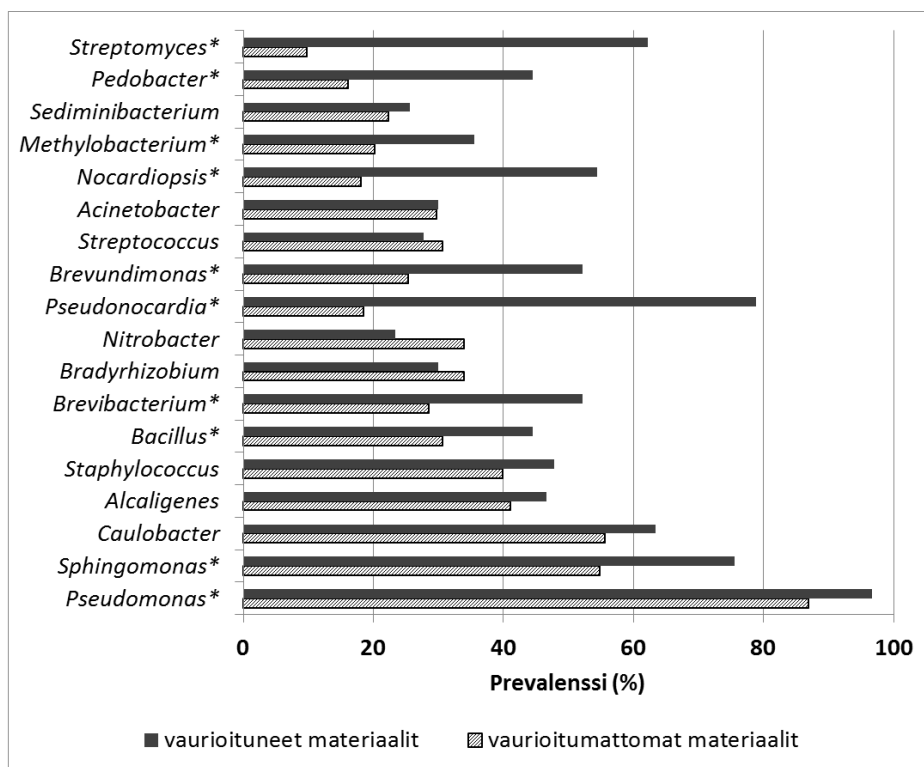
*Taulukko 1. Näytteiden määrät materiaaliluokittain ja viljelyn vaurioituneiden ja vaurioitumattomien luokissa (0= ei vauriota, 1= vaurio); * seka= sekalaiset materiaalit.*

Bakteerien sekvenssidata (n=426)				Sienten sekvenssidata (n=413)			
		Viljelymenetelmän mukaan vaurioitunut vs. vaurioitumaton näyte (bakteerit)				Viljelymenetelmän mukaan vaurioitunut vs. vaurioitumaton näyte (sienet)	
		0	1			0	1
Materiaali	Puu	102	27	Materiaali	Puu	83	40
	Villa	154	44		Villa	113	84
	Betoni	10	5		Betoni	11	4
	Kipsilevy	7	1		Kipsilevy	6	1
	Muovi	25	3		Muovi	24	5
	Paperi	12	4		Paperi	10	5
	Seka*	26	6		Seka*	13	14
	Yhteensä	336	90		Yhteensä	260	153

TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Rakennusmateriaalinäytteet olivat pääasiallisesti puuta tai eristemateriaaleja (Taulukko 1.) Bakteerien sekvenssidata muodostui 336 vaurioitumattomasta ja 90 vaurioituneesta näytteestä, joiden luokittelu perustui viljelytulokseen. Sienten sekvenssidata jakaantui seuraavasti; 260 vaurioitumatonta näytettä ja 153 vaurioitunutta näytettä.

Näytteistä havaittiin yhteensä 869 eri bakteerisukua ja 282 sienisukua. Kaikista näytteistä havaittiin yleisimpinä bakteerisukuina *Pseudomonas* (89 %), *Sphingomonas* (59%), *Caulobacter* (57 %), *Alcaligenes* (42 %) ja *Staphylococcus* (42 %). Yleisimmät sienisuvut taas olivat *Aspergillus* (57 %), *Penicillium* (43 %), *Wallemia* (24 %) ja *Acremonium* (15 %).

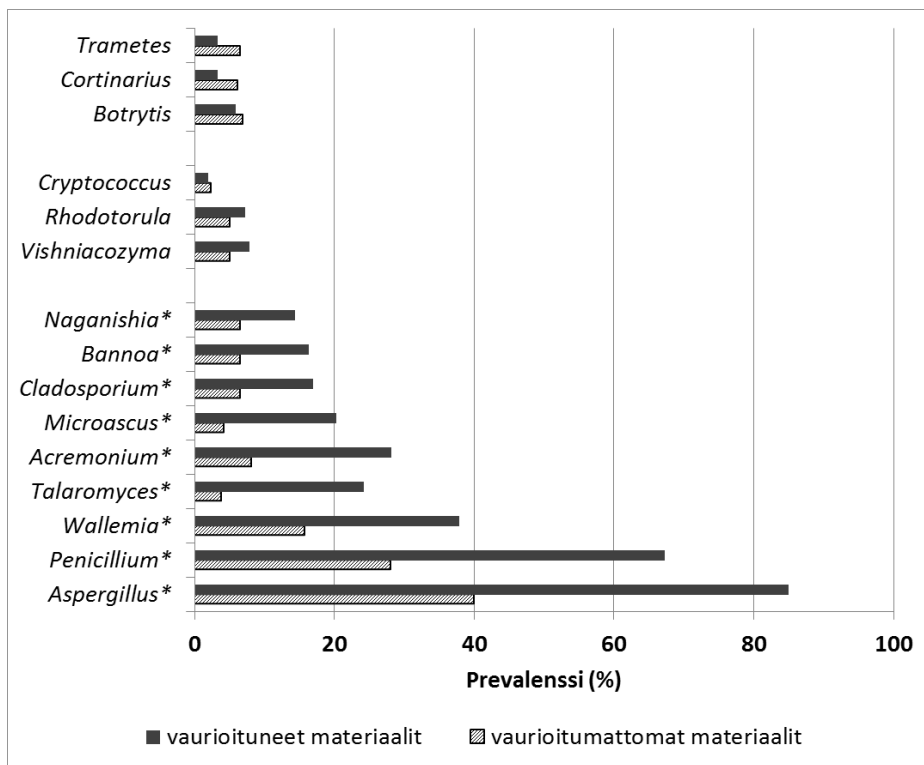


Kuva 1. Yleisimpien bakteerisukujen esiintyvyys (prevalenssi) vaurioituneissa ja vaurioitumattomissa materiaaleissa (* p -arvo < 0.05 Chi-Square testissä).

Löysimme useita bakteerisukuja, jotka olivat tilastollisesti merkitsevästi yleisempiä vaurioituneissa materiaaleissa verrattuna vaurioitumattomiin materiaaleihin, kun luokittelu perustui viljelyyn. Kuvassa 1 on esitetty lista yleisimmistä tässä tutkimuksessa havaituista bakteerisuvuista. Osa kuvan 1 bakteerisuvuista esiintyi lähes samalla tavoin (esim. *Caulobacter*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Bradyrhizobium*, *Streptococcus*) vaurioituneissa ja vaurioitumattomissa näytteissä. Joidenkin bakteerisukujen osalta tilastollisesti merkitsevät erot olivat verrattain pieniä (esim. *Pseudomonas*). Suurin osa sekä vaurioituneista että vaurioitumattomista näytteistä havaituista bakteereista tunnetaan yleisesti olevan ihmisperäisiä tai yhteydessä ulkoilmälähteisiin, kuten maaperään tai ulkoilmaan. Tällaiset mikrobihavainnot rakennusmateriaalinäytteessä

viittaavat enemmän pintakontaminaatioon tai ajan saatossa tapahtuneeseen kertymiseen kuin mikrobikasvuun. Suurimpia eroja vaurioituneiden ja vaurioitumattomien näytteiden välillä havaittiin mm. seuraavilla mikrobeilla: *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Actinomycespora*, *Nocardiosis*, *Nocardioides*, *Mycobacterium* ja *Devosia*, jotka fylogeneettisesti kuuluvat luokkaan Actinobacteria ja Alphaproteobacteria. Myös ANCOM-analyysi toi esiin monia edellä mainituista taksonista. Useat em. mikrobeista tuottavat rihmamaista kasvua elatusalustalla ja tunnistetaan viljelyllä aktinomykeeteiksi pesäkemorfologian perusteella. Tämä molekyylibiologisin menetelmin tehty havainto Actinobacteria-luokan mikrobeista on yhtenevä viljelymenetelmän morfologisen tunnistamisen kanssa ja voi täten toimia hyvänä indikaattorina rakennusmateriaalin mikrobikasvulle. Toisaalta tutkimuksemme osoittaa myös, että bakteerien esiintyminen rakennusmateriaaleissa vaurioituneissa on monimuotoista. Havaitimme yli 70 bakteerisukua, joita esiintyi vähintään 20 % vaurioituneissa materiaaleissa, kun taas vastaavasti 14 bakteerisukua havaittiin vain ei-vaurioituneissa materiaaleissa. Yli 100 sukua oli vähintään 10-kertaisesti yleisempiä vaurioituneissa kuin vaurioitumattomissa materiaaleissa. Nämä mikrobit kuuluvat erilaisiin fylogeneettisiin linjoihin, joita ei yleisesti esiinny rakennusmateriaaleissa ja ovat siksi erityisen harvinaisia vaurioitumattomissa materiaaleissa. Tällaiset mikrobit voivat myös osoittautua kosteusvaurioindikaattoreiksi yleisesti tunnettujen aktinobakteerisukujen lisäksi. Tällä hetkellä pyrimme tunnistamaan sekvensointidatan avulla mikrobikasvuun liittyviä indikaattorimikrobeja ja luomaan sellaisia malleja, jotka voisivat luotettavasti ennustaa rakennusmateriaalinäytteiden mikrobivaurion.

Arvioimme myös sienten sekvensointituloksia indikaattorilajien tunnistamiseksi vertaamalla viljelymenetelmällä määritettyjen vaurioituneiden ja vaurioitumattomien näytteiden sekvensointituloksia. Bakteeriaineistoon, verrattuna, havaitimme ylipäättään vähemmän sukuja ja lisäksi vähemmän sukuja, jotka olivat yleisiä kaikissa näytteissä. Havaitimme yhdeksän sienisukua, jotka olivat yleisempiä vaurionäytteissä kuin vaurioitumattomissa näytteissä. Näiden esiintyvyys oli yli 10 % (kuva 2). Näitä sienisukuja olivat *Aspergillus* (havaittiin 85% vaurionäytteistä), *Penicillium* (67%), *Wallemia* (38%), *Acremonium* (28%), *Talaromyces* (24%), *Microascus* (20%), *Cladosporium* (17%), *Bannoia* (16%) ja *Naganishia* (14%) (näistä kaksi viimeistä ovat hiivoja). Myös ANCOM -analyysillä havaitimme *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* ja *Naganishia* -sukujen olevan yleisempiä vaurioituneissa kuin vaurioitumattomissa näytteissä. Sienisekvenssitietoaineistossa havaitsemme myös sekvenssityyppejä, jotka eivät ole merkittävästi yleisempiä vaurioituneissa materiaaleissa verrattuna vaurioitumattomiin rakennusmateriaaleihin. Tällaisia ovat esimerkiksi hiivasuvut *Cryptococcus*, *Rhodotorula* ja *Vishniacozyma*, jotka ovat todennäköisesti peräisin ihmisistä tai ulkoa (maaperästä), sekä *Botrytis*-, *Cortinari*- ja *Trametes*-sekvenssit, joiden lajeihin kuuluu tavallisia metsäsieniä sekä ruokaa ja puuta mädättäviä sieniä (kuva 2). Tämänhetkiset tavoitteemme ovat syvemmän taksonomisen ymmärryksen hankkiminen niistä sienilajeista, jotka liittyvät mikrobikasvuun rakennusmateriaaleissa, sekä ennakoivien mallien kehittäminen sekä sienille että bakteereille.



Kuva 2. Yleisimpien sienisukujen esiintyvyys (prevalenssi) vaurioituneissa ja vaurioitumattomissa materiaaleissa sekä esimerkkinä prevalenssit hiivoista (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Vishniacozyma*) ja muista ei-rakennukseen liittyvistä sienistä (esim. *Botrytis*, *Cortinarius*, *Trametes*). (* p -arvo < 0.05 Chi-Square testissä).

Tämä tutkimus on ensimmäinen, jossa NGS-menetelmää käytetään kosteusvaurioihin liittyvän mikrobikasvun määrittämiseen, yhdistämällä yli 400 rakennusmateriaalinäytteen sekvensointi- ja viljelytulokset. Tutkimus tullaan julkaisemaan kokonaisuudessaan tieteellisessä julkaisussa sisältäen sekvenssidatan. Tunnistimme tutkimuksessa useita bakteeri- ja sienilajeja, jotka olivat yleisempiä vaurioituneissa materiaaleissa verrattuna vaurioitumattomiin. Osa näistä lajeista voi osoittautua hyödyllisiksi kosteusvaurioindikaattoreiksi, joiden tunnistaminen onkin meneillään olevien tutkimustemme yksi keskeinen tavoite. Toisaalta on tärkeää tietää, että materiaalinäytteistä löytyy lajeja, joiden esiintyvyys ei eroa vaurioituneissa ja vaurioitumattomissa näytteissä. Onkin todennäköistä, että nämä lajit ovat peräisin ihmisestä itsestään tai ulkoilmalähteistä. DNA-sekvensoinnilla saatu tieto materiaalinäytteiden bakteeri- ja sienikoostumuksesta auttaa selvittämään mikrobikontaminaation lähteet sekä arvioimaan mahdollisen mikrobikasvun esiintymistä.

Tieteellisesti kiinnostavaa tässä tutkimuksessa on mikrobiston muutoksen arviointi suoraan vaurioituneesta rakennusmateriaalista. Havaitsemalla tiettyjä kosteusvaurioihin yhteydessä olevia mikrobitalkoneja, voidaan tätä tietoa käyttää jatkossa mahdollisesti myös muiden näytetyyppien, kuten ilma- tai pölynäytteiden tutkimiseen. Tämä puolestaan mahdollistaisi havaittujen kosteusvaurioindikaattoreiden terveysvaikutusten

merkityksen arvioinnin epidemiologisissa tutkimuksissa. On tärkeää korostaa, että tutkimuksessa löydetty bakteeri- ja sienitaksonit näyttävät olevan yhteydessä mikrobivaurioon ja rakennusmateriaalin muutokseen, mutta niiden mahdollinen potentiaali terveysvaikutusten syntyyn jää vielä selvittämättä.

KIITOKSET

Haluamme kiittää Sosiaali- ja terveysministeriötä (STM) tutkimuksen taloudellisesta tukemisesta. Tutkimus kuuluu osana REMEDIAL konsortiotutkimusta, jota Suomen Akatemia rahoittaa (hankkeet 296587 ja 296724).

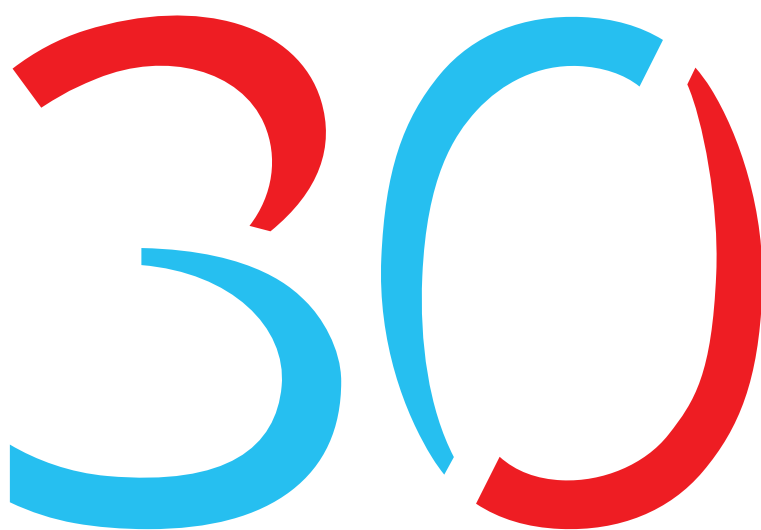
LÄHDELUETTELO

1. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2017. Microbiomes of the Built Environment: A Research Agenda for Indoor Microbiology, Human Health, and Buildings. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/23647>.
2. Gilbert, J. A., Stephens, B. (2018) Nature Reviews Microbiology 16:661–670.
3. Kirjavainen, P. V., Karvonen, A. M., Adams, R. I., et al. (2019) Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. Nature Medicine 25:1089–1095.
4. Jayaprakash, B., Adams, R., Kirjavainen, P., et al. (2017) Indoor microbiota in severely moisture damaged homes and the impact of interventions. Microbiome 5:138. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0356-5>
5. Sylvain, I. A., Adams, R. I., Taylor, J. W. (2019) A different suite: The assemblage of distinct fungal communities in water-damaged units of a poorly-maintained public housing building. PLoS One 14(3):e0213355.
6. Hegarty, B., Haverinen-Shaughnessy, U., Shaughnessy R. J., Peccia, J. (2019) Spatial Gradients of Fungal Abundance and Ecology throughout a Damp Building Environmental Science & Technology Letters 6 (6):329-333.
7. Mendell, M. J., Adams, R. I. (2019) The challenge for microbial measurements in buildings. Indoor Air 29(4):523-526.
8. Asumisterveysasetuksen soveltamisohje Osa IV, Asumisterveysasetus § 20. Valvira ohje 8/2016.
9. Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods 13 : 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869.
10. Callahan, B. (2018) Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 132) [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1172783>
11. UNITE Community (2019): UNITE general FASTA release for Fungi. Version 18.11.2018. UNITE Community. <https://doi.org/10.15156/BIO/786343>
12. Davis, N.M., Proctor, D., Holmes, S.P., et al. (2018) Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. Microbiome 6: 226 . doi: 10.1101/221499
13. Mandal, S., Van Treuren, W., White, R.A., Eggesbø, M., Knight, R., Peddada, S. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. Microb Ecol Health Dis, 26:27663.

SISÄILMASTOSEMINAARI

2020

Messukeskus, Helsinki
10.3.2020



SISÄILMAYHDISTYS

Sisäilmayhdistys ry

SISÄILMASTOSEMINAARI 2020

10.3.2020

Toimittajat:

Mervi Ahola
Anna Merikari