

SBI - prøve.



# Mikroorganismer i vandskadede bygninger

– en midtvejsrapport

Udarbejdet for Bygge- og Boligstyrelsen

**SBI-MEDDELELSE 115 · STATENS BYGGEFORSKNINGSINSTITUT 1996**



# Mikroorganismer i vandskadede bygninger

– en midtvejsrapport

SUZANNE GRAVESEN  
BIRGITTE ANDERSEN  
MIKAEL Ø. HANSEN  
RANDI IVERSEN  
THOMAS O. LARSEN  
PETER A. NIELSEN  
KEN WILKINS

STATENS BYGGEFORSKNINGSINSTITUT  
EX-1  
13 MRS. 1996

00524 P



**SBI-meddelelser** er foreløbige rapporteringer og beretninger om forundersøgelser, konferencer, symposier mv.

**SBI-publikationer** udgives i følgende serier: Anvisninger, Rapporter, Meddelelser, Byplanlægning og Beton. Publikationerne fås gennem boghandelen eller ved at tegne et SBI-abonnement. Instituttets årsberetning, publikationskatalog og publiceringsdiskette er gratis og kan rekvireres fra SBI.

**SBI-abonnement** er en rabatordning med mange fordele for dem, der vil sikre sig løbende orientering om væsentlige udgivelser inden for byggeforskningsområdet. Ring til SBI og hør nærmere.

ISBN 87-563-0915-5.

ISSN 0107-4180.

Pris: Kr. 150,00 inkl. 25 pct. moms.

Oplag: 300 eksemplarer.

Tekstbehandling: Yelva Jensen og Ulla Seitzberg Nielsen.

Tryk: SBI, Hørsholm.

Statens Byggeforskningsinstitut:

Postboks 119, 2970 Hørsholm.

Telefon 42 86 55 33.

Eftertryk i uddrag tilladt, men kun med kildeangivelsen:

*SBI-meddelelse 115: Mikroorganismer i vandskadede bygninger*

– en midtvejsrapport. 1996.

# Indhold

Forord .....	4
Resume .....	5
Byggetekniske perspektiver .....	6
Foreløbige konklusioner .....	6
Indledning .....	8
Baggrund .....	8
Materialer og metoder .....	10
Delprojekt 1: Fremstilling og tilsåning af gipssubstrater .....	10
Delprojekt 2: Indsamling af inficerede byggematerialer, bygningsanamnese og identifikation af de forekommende skimmelsvampe	11
Resultater og diskussion .....	13
Faktorforsøget (delprojekt 1) .....	13
Inficerede byggematerialer og skimmelsvampe (delprojekt 2) ...	14
Litteratur .....	19
Bilag 1 .....	23
Uddrag af Randi Iversens eksamensprojekt	
Bilag 2 .....	41
Skema til bygningsgennemgang	
Bilag 3 .....	45
Dyrkningssvar fra ALK, Allergologisk Laboratorium, København	
Bilag 4 .....	59
Materialeskemaer	
Bilag 5 .....	89
Resultater fra analyser udført på AMI og DTU	



# Forord

I 1994 gennemførtes en præliminær undersøgelse af inficerede byggematerialer udtaget fra vandskadede bygninger. I denne undersøgelse blev der indhøstet erfaringer med hensyn til vækst af skimmelsvampe på byggematerialer og dannelse af såvel faste som flygtige stofskifteprodukter fra skimmelsvampene under vækst. Ligeledes kunne der registreres en række humane effekter, efter at personer, tilsigtet såvel som utilsigtet, var blevet udsat for de inficerede byggematerialer i de til forsøgene anvendte klimakamre (Climpaqs).

Såvel de byggetekniske som sundhedsmæssige observationer har begrundet en fortsat undersøgelse, således at der kan ske en kortlægning af risikokonstruktioner og risikomaterialer og i et vist omfang sættes navne på organismer og stoffer, der dannes ved vækst på byggematerialerne under svær og langvarig opfugtning. Hertil er der bevilget midler fra Bygge- og Boligstyrelsen, og projektet strækker sig foreløbig til udgangen af 1996. Delprojekt 1 og hovedparten af delprojekt 2 publiceres her som midtvejsrapport.

Delopgaverne i dette tværfaglige samarbejdsprojekt er udført af: Birgitte Andersen, ALK (svampeidentifikation), Mikael Østergaard Hansen, Birch & Krogboe (indsamling af byggematerialer), Thomas O. Larsen, Kristian Fog Nielsen, Institutet for Bioteknologi, DTU (påvisning af mykotoksin og VOC) og Ken Wilkins, AMI (VOC analyser). Endvidere har Peter A. Nielsen, SBI, foretaget de materiale- og fugttekniske vurderinger. Randi Iversen, SBI og DTU, har etableret en metode til belysning af forskellige fysiske og kemiske faktorerers indflydelse på mikrobiel vækst på byggematerialer, og som optakt til den sidste del af projektet, der omhandler betydningen af bygge-, fugt- og materialetekniske forhold for svampevækst, er der påbegyndt undersøgelser bl.a. ved hjælp af en såkaldt FLEC (Field Laboratory Emission Chamber) til nærmere bestemmelse af svampenes emissioner under realistiske betingelser i indeklimaet.

Denne midtvejsrapport, udarbejdet af Suzanne Gravesen, SBI, som ligeledes er koordinator for projektet, omfatter undersøgelser, som endnu ikke er tilendebragt, men de hidtidige resultater publiceres nu med henblik på hurtigst muligt at give information til byggebranchen.

Projektet er udført under Byggestyrelsens journal nr. B4-1255-13.

STATENS BYGGEFORSKNINGSINSTITUT  
Afdelingen for Energi og Indeklima, december 1995  
Erik Christophersen, forskningschef

# Resume

Projektets første fase (delprojekt 1) har omfattet udvikling af metoder til undersøgelse af vækstbetingelser for skimmelsvampe på byggematerialer. For at kunne variere og dermed screene forskellige faktorerers indflydelse på væksten under så realistiske betingelser som muligt, er der eksperimentelt udviklet forskellige gips-agar substrater, som er tilsået med skimmelsvampen *Stachybotrys chartarum (atra)*, kendt for at kunne etablere sig på langvarigt opfugtede celluloseholdige materialer, fx gipskartonplader.

Gipsgrundsubstraterne er udviklet ud fra to forskellige gipstyper, hvor der efter podning af svampen kunne konstateres vækst i løbet af 2 uger. Efter at det havde vist sig muligt at inducere vækst på de to substrater, er der screenet for betydningen af følgende fem faktorer: vandaktivitet ( $a_w$ ), temperatur, nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), salt ( $\text{NaCl}$ ) og cellulose.

Alle faktorer er valgt med henblik på at undersøge deres hæmmende eller fremmende indflydelse på vækst og metabolitdannelse.

$\text{NaCl}$  (kogsalt) fordi salt for nogle svampes vedkommende anses for at være fremmende for væksten.

$\text{NaNO}_3$  (nitrat) fordi stoffet er beskrevet som hæmmende for produktionen af mykotoxiner.

Cellulose som fødekilde kan ligeledes have indflydelse på dannelsen af metabolitter.

Temperaturen som henholdsvis hæmmende/fremmende faktor.

Fugtighed i form af substratets vandaktivitet ( $a_w$ ) igen som hæmmende/fremmende faktor.

pH som faktor er ikke medtaget, idet gipskarton synes at have en stor bufferkapacitet, således at pH stort set forbliver uændret efter forsøg på regulering af pH med syre/base.

Som responsvariable er valgt diameteren af de fremvoksede svampekolonier samt arealstørrelsen under de toppe, der er fremkommet ved højtryksvæskrokromatografi (HPLC) til detektion af ikke-flygtige stofskifteprodukter, som svampen danner under væksten.

Til detektion af flygtige stofskifteprodukter blev der anvendt gas-kromatografi med massespektrometer.

I projektets anden fase (delprojekt 2) udtages løbende prøver af skimmelsvamp-inficerede byggematerialer fra områder med længerevarende massive vandskader. Dette gøres i forbindelse med en systematisk gennemgang af vandskadede offentlige bygninger, hvor de kommunale forvaltninger har ønsket en tilstandsvurdering af deres bygninger. I forbindelse hermed er der udarbejdet et bygningssskema (se bilag 2), som er udfyldt i forbindelse med udtagelsen af hvert enkelt materiale. Skemaet har dannet grundlag for beskrivelsen af konstruktioner og materialer, set i sammenhæng med risikoen for mikrobiel forurening.

Der er fra samtlige byggematerialer udtaget prøver ved hjælp af aftryksplader til påvisning af skimmelsvampeforekomsten, således at

der kunne tegnes et billede af, hvilke svampe der hyppigst optræder i forbindelse med våde bygninger.

På grundlag af analyserne fra de indtil nu undersøgte materialer er de 10 hyppigst forekommende svampeslægter: *Penicillium*, *Aspergillus*, *gær*, *Ulocladium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Trichoderma* og *Paecilomyces*.

### *Byggetekniske perspektiver*

Ud fra en foreløbig bearbejdning og opgørelse af beskrivelser og data for de første 28 indsamlede byggematerialer fremgår det, at de tre helt fremtrædende årsager til opfugtede byggematerialer i de bygninger, materialerne er indsamlet i, er: 1) Utætheder i og ved tagkonstruktionerne, 2) Indtrængning af grundfugt og 3) Utætte installationer. Det skal understreges, at opgørelsen ikke er endelig, og at de indsamlede materialer og bygningerne, de er indsamlet i, ikke er repræsentative for den danske bygningsmasse.

Der er som regel tale om langvarige opfugtninger, og udbredt svampevækst kunne være undgået, såfremt den fortsatte opfugtning var blevet stoppet relativt hurtigt efter at vandindtrængningen i konstruktionerne og materialerne var startet.

For materialernes vedkommende forsøges udregnet et indeks for svampevækst. Det er endnu for tidligt at sige, om dette indeks er dækkende for et materiales potentiale for svampevækst.

Gipsplader, som er brugt som model i faktorforsøget, og som grundlag for udvikling af en standardmetode til undersøgelse af vækst og emissioner fra opfugtede byggematerialer, lader sig kun modvilligt inficere af *Stachybotrys* under eksperimentelle betingelser. Når der ved en bygningsgennemgang kan konstateres udbredt vækst af denne svamp, kan man derfor formentlig gå ud fra, at skaden skyldes langvarig og kraftig opfugtning (fra måneder til år).

Det skal understreges, at eftersom undersøgelsen kun er halvvejs gennemført, vil der fremkomme yderligere dokumentation og flere aspekter både på det byggetekniske og det mikrobiologiske område.

### *Foreløbige konklusioner*

Baseret på de indtil nu gennemførte undersøgelser kan der konkluderes at:

- det har været muligt at udvikle en metode, der vil kunne anvendes som standard til belysning af forskellige faktorerers indflydelse på vækst og emission fra mikroorganismer på byggematerialer.
- det for første gang i en systematisk dansk undersøgelse er vist, hvilke svampe, der hyppigst er repræsenteret på de undersøgte opfugtede materialer, som indgår i det oprettede materialebibliotek.
- fra en stamme isoleret i problembygning af skimmelsvampen

*Stachybotrys chartarum*, som ses at inficere forskellige byggematerialer, er det giftige stof Satratoxin H for første gang i Danmark isoleret og identificeret. Det vil sige, at man formentlig kan bruge en del af stoffet som markør i fremtidige feltundersøgelser.

- fra *Stachybotrys* har det ligeledes været muligt for første gang at påvise 13 flygtige svampestoffer (mVOC'er), som emitteres under svampens vækst.

På det byggetekniske område vurderes det på grundlag af de prelimnære data at:

- manglende vedligeholdelse af tagkonstruktioner og installationer, samt problemer med grundfugt er de overvejende årsager til vækst af mikroorganismer i vandskadede bygninger.

# Indledning

## Baggrund

Formålet med projektet har været, over en tre-årig periode at gennemføre en bred tværfaglig undersøgelse af mikroorganismernes betydning for indeklimaet med en kombineret byggeteknisk og humanbiologisk indfaldsvinkel.

Foruden den rent biologiske information om organismer og emissioner fra disse har det været hensigten at afdække risikokonstruktioner og -materialer for allerede efter første år at kunne give information til byggebranchen.

I de senere år har der været et øget antal indeklimaklager i forbindelse med ikke-industrielle offentlige arbejdsplader såsom skoler og børnehaver og kontorer. Klagerne har været mest udtalte i vandskadede bygninger, hvor vedligeholdelse og bygningsrenovering har været nedprioriteret med heraf følgende udbredte angreb af mikroorganismer.

## Årsager til vandskade

Konstruktioner som flade tage, manglende tagudhæng, skjulte rørføringer og beklædte skillevægge har fremmet risikoen for vandskade og dermed muligheden for mikrobiel vækst. Endvidere ses utilstrækkelige omfangsdræn, manglende vedligeholdelse af bygningerne og forkert udført renovering at være en medvirkende årsag til vandpåvirkning.

## Indeklimaklager i vandskadede bygninger

En del af de symptomer, der rapporteres, kan diagnosticeres som specifik eller uspecifik hyperreaktivitet. Ved hyperreaktivitet forstås en særlig kraftig og hurtig indsættende reaktion i de udsatte personers hud, slimhinder eller indre organer på påvirkninger, der tåles reaktionsløst af de fleste.

Den specifikke immunologisk betingede hyperreaktivitet - allergien - kan forholdsvis let diagnosticeres, hvorimod den ikke-immunologisk betingede overfølsomhed og Sick-Building-Syndrome-symptomerne, som muligvis kan henføres hertil, er vanskeligere at verificere.

## Mikroorganismer og indeklime

Der vil i enhver bygning være en naturlig baggrundsbelastning af mikroorganismer hidrørende dels fra udendørs luft, dels fra de personer, der opholder sig i bygningen. Denne naturlige flora er velbelyst og adskiller sig kvantitativt og ofte kvalitativt fra den mikrobielle flora, man ser i de våde bygninger. Floraens sammensætning vil være afhængig af typen af materialer, der indgår i bygningen samt disses vandaktivitet. Forekomsten af mikroorganismer på byggematerialer og forudsætningen for vækst og emissioner har hidtil ikke været systematisk undersøgt, således som det er gjort i denne undersøgelse. Dette

gøres bedst ved at undersøge floraen direkte på de inficerede materialer, frem for at måle luftbårne kim, en metode som tidligere har været mest udbredt.

## Mikroorganismernes specifikke stoffer

Både bakterier og svampe indeholder i cellevæggen stoffer, som er farmakologisk aktive, idet de har både inflammatoriske og immunologiske effekter. Med en fælles betegnelse kan de benævnes endotoxiner. De indgår som byggesten i cellens struktur og er altså ikke stofskifteprodukter, der produceres under nedbrydning af et givet substrat. Dette er en ændret definition af ordet endotoxin, der nu ikke alene omfatter lipopolysaccharid fra gram-negative bakteriers cellemembran, men også peptido-glucaner fra gram-positive bakterier og glukaner fra svampenes cellevæg.

Lipopolysaccharid (LPS) kan aktivere forskellige celler i immunsystemet, fremkalde inflammation og forstærke immunforsvaret fx hos en allergiker på en måde, så et astmaanfald forstærkes. Effekten af LPS ses ligeledes ved luftfugtersyge og organisk toksisk støvsyndrom (ODTS). Peptido-glukan har lignende effekter.

$\beta$ -1-3-D-Glukan er en byggesten i cellevæggen hos svampe. Ved udsættelse for glukane øges følsomheden for endotoxin og andre inflammatoriske stoffer. Eksponeringsforsøg med inhalation med isoleret glukane har givet anledning til tilstoppet næse, svie i halsen, hovedpine og træthed. Samme symptomer, som er set ved provokationsforsøg med svampeinficerede byggematerialer.

## Sundhedseffekter ved svampe-eksponering

Specifik allergi overfor skimmelsvampe er velkendt, men ikke så udbredt som allergi overfor andre indendørs-allergener. Selvom respiratoriske symptomer er rapporteret i en del af de undersøgte sager, har det sjældent været muligt at påvise en specifik svampeallergi. Derimod har man med den øgede viden om sundhedsproblemer i våde bygninger angrebet af mikroorganismer arbejds-hypoteser om virkningsmekanismer, der dels peger på effekter fra mikroorganismernes vægstoffer, som de ovenfor beskrevne, dels på toksiske effekter fra mycotoxiner og VOC'er, som produceres under svampenes vækst. Man anser de giftige stofskifteprodukter, som bl.a. findes i og på sporerne for at være en meget betydende faktor, ligesom frigørelsen af luftformede stoffer (VOC) fra svampene under deres vækst er med til at forringe indeklimaet.

# Materialer og metoder

I det følgende gives en kortfattet gennemgang af de materialer og metoder, der har været brugt i forbindelse med projektet.

Den interesserede kemiker eller mikrobiolog henvises til bilag 1 og 5, hvor en detaljeret beskrivelse af de enkelte forsøg, der har indgået i projektet, er at finde.

## *Delprojekt 1: Fremstilling og tilsåning af gipssubstrater*

For at opnå så realistiske betingelser som muligt blev der ud fra pulveriserede gipsplademasser fra henholdsvis gipskartonplader (DA) og fibergipsplader (FI) fremstillet steril gipsagar i 9 cm petriskåle.

Petriskålene blev tilsået med en sporesuspension fra et isolat af svampen *Stachybotrys chartarum* (IBT nr. 14915), som er isoleret fra en vandskadede bygning.

### **Regulering og bestemmelse af substraternes vandaktivitet**

Til indstilling af den ønskede vandaktivitet blev brugt glycerol ca. 87 pct. af mærket Merck. Til bestemmelsen brugtes en Novasina  $a_w$ -box, og der udførtes 3-dobbelt bestemmelse ved 25 °C.

### **Tilsætning og regulering af de fem vækstfaktorer, der undersøgte for indflydelse på vækst og metabolitdannelse**

#### *Nitrat (NaNO<sub>3</sub>)*

1 pct. natriumnitrat (Merck) blev tilsat dyrkningsmediet, idet svampen angives at producere toxiner ved tilstedeværelse af nitrat.

#### *Kogsalt (NaCl)*

5 pct. salt (Merck) blev ligeledes tilsat mediet, idet svampen er anført som saltelskende (halofil). Begge stoffer tilførtes det flydende medium inden autoklavering.

#### *Cellulose*

Der var på forhånd tilsat cellulose, idet gipstypen FI har et stort (ikke nærmere deklareret) indhold af cellulose, mens gipstypen DA har et lavt indhold.

#### *Temperatur*

Temperaturen under inkuberingen blev varieret mellem 20 °C og 30 °C.

#### *Fugtighed*

Fugtigheden i substratet, her benævnt vandaktivitet, der udtrykker fugttilgængeligheden (damptrykket af vand i substratet/damptrykket af rent vand), blev indstillet mellem 0,96  $a_w$  og 0,98  $a_w$ .

Substratets egen vandaktivitet var på 0,98  $a_w$ .

### **Påvisning af ikke-flygtige stofskifteprodukter fra *Stachybotrys***

Svampens faste stofskifteprodukter blev påvist som beskrevet i Filtenborg et al. (1983) fra sporer (intracellulære metabolitter) ved ekstraktion med methanol-chloroform og efterfølgende tyndtlagschromatografi (TLC). Stofskifteprodukter fra substratet (extracellulære metabolitter) blev påvist ved direkte applikation af en substratprop på TLC-pladen. En grundigere analyse af de faste metabolitter blev foretaget med omvendt high performance væske chromatografi (HPLC).

### **Påvisning af flygtige stofskifteprodukter (mVOC) fra *Stachybotrys***

Flygtige stofskifteprodukter blev opsamlet på kulrør og analyseret med gaschromatograf og massespektrometer (GC-MS) efter Larsen & Frisvad (1994). De fremkomne spektre blev identificeret ved at sammenligne med spektre i en eksisterende database. Mængden af de fundne stoffer blev kvantificeret ved sammenligning med intern standard.

### **Statistiske beregninger**

Forsøget er udført som et partielt 2<sup>5</sup> faktorforsøg. Til den statistiske behandling af resultaterne er brugt programmet MODDE, et pc-windows program specielt udviklet til planlægning og evaluering af eksperimentelt arbejde. Endvidere anvendes multipel lineær regression (MLR) til brug for tilpasning af data til den valgte lineære model med interaktioner.

## *Delprojekt 2: Indsamling af inficerede byggematerialer, bygningsanamnese og identifikation af de forekommende skimmelsvampe*

Byggematerialer blev indsamlet i forbindelse med bygningsgennemgang med det formål at give en tilstandsvurdering af de pågældende bygninger, overvejende skoler og andre offentlige ikke industrielle arbejdspladser. Samtidig med at der blev udtaget materialer, som blev anbragt i aromataette plastikposer, blev et anamnese-skema for bygningen (bygningens sygehistorie) udfyldt med relevante oplysninger for denne undersøgelse, se bilag 2. Skemaerne er udarbejdet med henblik på at indsamle de fornødne baggrundsoplysninger til belysning af årsagerne til, og under hvilke omstændigheder de pågældende skimmelsvampe har kunnet etablere sig på materialerne. De indhentede erfaringer kan indgå i grundlaget for eventuel senere udarbejdelse af vejledninger eller anvisninger, og eventuelt afdække behov for yderligere forskning.

Fra materialerne blev der ved hjælp af 5 cm petriskåle med V-8 agar (kontaktplader) foretaget aftryk, og materialerne blev umiddelbart herefter igen anbragt i de aromataette poser.

Dyrkningspladen, som er anvendt ved aftryksprøven, har været anbragt på det sted på materialet, hvor væksten var mest synlig for det blotte øje.

Petriskålene blev herefter inkuberet ved 25 °C og inspiceret på tredjedagen og efter en uge. De fremvoksede kolonier blev talt og identificeret, om muligt til art efter gængse taxonomiske standardkriterier. I dyrkningssvaret blev det angivet, hvilke svampe, der blev fundet, og hvilke der dominerede prøven. Mængden af de fundne svampekolonier blev angivet som ringe (< 10), moderat (10-50) og massiv (> 50).

#### Opgørelse af byggematerialernes egenskaber

Det er vigtigt allerede i projekteringsfasen at kunne forebygge skimmelsvampevækst i den færdige bygning. Til dette brug er der forsøgt opstillet en række faktorer eller forhold ved et materiale og dets placering i den færdige bygning, der anses for at have betydning for etableringen og væksten af skimmelsvampe. Arbejdstitlen herfor er "indeks for potentiale for skimmelsvampevækst", hvor der på en skala fra 0 til 6 angives, hvor stor risiko der er for svampevækst, såfremt materialet opfugtes.

I indekset indgår materialets overfladestruktur, idet det antages, at jo grovere overfladestrukturen er, jo lettere kan skimmelsvampe etablere sig. På samme måde indgår materialets alder, belastning (slid) og renholdnings- og vedligeholdelsestilstand. Med alderen vil materialets overflade blive beskadiget og være udsat for forskellige nedbrydningsmekanismer. Jo større belastningen er, jo større er risikoen for at materialeoverfladen kan angribes af skimmelsvampe ved fugttilførelse. Det samme gør sig gældende, såfremt overfladen ikke bliver renholdt og vedligeholdt på passende måde. Hvis materialet er placeret et sted i bygningen, hvor det er vanskeligt at renholde og vedligeholde dets overflade, anses dette også for at være en faktor, der forøger risikoen for svampevækst.

På nuværende tidspunkt er der ikke tilstrækkelig viden til at kunne graduere de enkelte faktorer, ligesom de indgår i indekset med samme vægt. Hvis fx et materiales overfladestruktur er grov eller glat, så indgår denne faktor i indekset med henholdsvis karakteren 1 eller 0.

## Resultater og diskussion

### Faktorforsøget (delprojekt 1)

På trods af, at det i laboratorieregi har vist sig vanskeligt at få *Stachybotrys chartarum* til at vokse på de gængse svampesubstrater, som skulle tilgodeses svampens vækst optimalt, har det været muligt at udvikle et dyrkningsmedium ud fra selve gipskartonplade-materialet til undersøgelse af 5 forskellige faktoreres indflydelse på vækst og emission. Svampen koloniserer kun langsomt på såvel de kunstige som de naturlige substrater. Der går fra tre til fire uger før kraftig vækst er etableret, hvorfor det må antages, at udbredt vækst på materialer i bygninger har taget fra måneder til år for at nå en udbredelse af m<sup>2</sup>-omfang. Det vil med andre ord sige, at udbredt vækst af denne svamp i en bygning kunne være undgået ved passende indgriben i tide. Endvidere at der er rigelig tid til at foretage de fornødne reoveringer inden gipsmaterialerne bliver angrebet.

Ved at det er lykkedes at fremstille et gipspladesubstrat som tilgodeser *Stachybotrys*' vækstkrav er der etableret en metode, der vil kunne anvendes som standard til accelererede forsøg med forskellige byggematerialer og forskellige svampe, hvilket var det ene af projektets delmål.

Det kan ud fra forsøgene konkluderes, at materialets vandaktivitet ( $a_w$ ), se side 10, er den vigtigste parameter for vækst. En vandaktivitet på 0,96, som i sig selv er meget høj, gav en markant dårligere vækst end en  $a_w$  på 0,98, hvilket igen vil sige, at hvis gipskartonpladerne er tørre ( $a_w < 0,50$ ) ved opsætning og forbliver tørre i bygningens levetid er der ikke mulighed for mikrobiel vækst.

Der kunne ved de gaschromatografiske analyser ikke påvises luftformige stofskifteprodukter (flygtige metabolitter - mVOC) under selve faktorforsøget. Det har dog været muligt at påvise flygtige stoffer i den senere fase af projektet (delprojekt 2).

Der blev i faktorforsøget påvist op til 65 forskellige faste stofskifteprodukter ved HPLC analyserne. Under afviklingen af denne del af projektet var det ikke teknisk muligt at identificere de enkelte stofskifteprodukter.

Sammenhængen mellem de undersøgte faktorer og metabolitproduktionen er kun delvis statistisk undersøgt, men tendensen er, at høj vandaktivitet og højt celluloseindhold virker fremmende på dannelsen af metabolitter, både hvad angår diversitet og mængde.

Temperaturen i intervallet 20-30 °C, som er undersøgt her, spiller en sekundær rolle, hvis materialet er fugtigt nok. Et tillæggsforsøg, hvor de tilsåede gipsplader blev inkuberet ved henholdsvis 25 og 5 °C, simulerende en sommer- og vintersituation, viste at der ved 5 °C sker en markant hæmning af væksten og en betydelig reduktion af de faste metabolitter: fra 32 til 15 for den ene gipstype, fra 18 til 4 for den anden types vedkommende.



## Inficerede byggematerialer og skimmelsvampe (delprojekt 2)

### Byggematerialer

I tabel 1 er der foretaget en foreløbig opgørelse af de første 29 materialer. Opgørelsen omfatter opførelsesår, årsag til svampevæksten, den periode materialerne har været opfugtet i bygningen samt opgørelsen af indeks for svampevækst.

Af den foreløbige opgørelse fremgår det, at årsagerne til svampevækst hovedsagelig fordeler sig på følgende tre grupper: Utætte tage, indtrængning af grundfugt og utætte installationer. I et enkelt tilfælde kan årsagen henføres til indtrængning af rengøringsvand. Der har som regel været tale om, at materialerne har været opfugtet længere end seks måneder i alt. Det udregnede indeks for svampevækst (se materialer og metoder, side 12), dvs. materialernes potentiale for vækst af skimmelsvampe, der omfatter overfladestruktur, vedligeholdelsestilstand, alder, slid belastning, tilgængelighed og renholdningstilstand, ligger i alle tilfælde i den høje ende af skalaen, der går fra 0 til 6, hvor 0 betegner lavt, 6 betegner højt potentiale.

Tabel 1. Opgørelse over de undersøgte 29 materialeprøver.

### BYGNINGENS OPFØRELSESÅR

Før 1960	12
1960 - 1970	8
1970 - 1980	6
1980 - 1990	
1990	3

### ÅRSAG

Utæt tag	19
Grundfugt	5
Installationer	7
Andet	1

### OPFUGTNINGSPERIODE

Mindre end 6 måneder	1
Længere end 6 måneder	25

### INDEKS FOR SVAMPEVÆKST

0	
1	
2	
3	4
4	9
5	8
6	8

### Skimmelsvampe

I tabel 2 ses hvilke 10 svampeslægter, der hyppigst er fundet på de indtil nu undersøgte materialer (46), der er udtaget fra bygningerne. Hyppigheden er udtrykt i pct. Endvidere angives hvilke arter, der er identificeret inden for de hyppigst fundne slægter.

Tabel 2. Antal og relativ hyppighed af fundne svampeslægter og -arter i materialeprøver (n = 46).

---

	Svampefund
<i>Penicillium</i> 70%	
<i>Penicillium chrysogenum</i> :	15
<i>Penicillium palitans</i> :	1
<i>Penicillium flavigenum</i> :	1
<i>Penicillium sp.</i> :	17
<i>Aspergillus</i> 33%	
<i>Aspergillus versicolor</i> :	3
<i>Aspergillus terreus</i> :	1
<i>Aspergillus ustus</i> :	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> :	1
<i>Aspergillus niger</i> :	2
<i>Aspergillus sydowii</i> :	3
<i>Aspergillus sp.</i> :	9
Gær 26%	
Gær sp.:	12
<i>Candida sp.</i> :	2
<i>Ulocladium</i> 22%	
<i>Ulocladium oudemansii</i> :	8
<i>Ulocladium chartarum</i> :	2
<i>Chaetomium</i> 20%	
<i>Chaetomium sp.</i> :	9
<i>Cladosporium</i> 15%	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> :	1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> :	3
<i>Cladosporium herbarum</i> :	2
<i>Cladosporium sp.</i> :	3
<i>Stachybotrys</i> 15%	
<i>Stachybotrys chartarum</i> :	7
<i>Acremonium</i> 15%	
<i>Acremonium sp.</i> :	7
<i>Trichoderma</i> 11%	
<i>Trichoderma harzianum/viride</i> :	5
<i>Paecilomyces</i> 11%	
<i>Paecilomyces sp.</i> :	5

---

### Faste og flygtige metabolitter

Som optakt til delprojekt 3 er det efter flere måneders arbejde på Institutet for Bioteknologi, DTU, lykkedes ved hjælp af HPLC at isolere og identificere det meget toksiske stofskifteprodukt Satratoxin H, som findes i sporerne hos *Stachybotrys*. Derved er der nu ved at blive etableret en standard, som kan bruges, bl.a. som reference ved fremtidige feltundersøgelser.

Herudover er der fundet mere end 50 ikke navngivne faste metabolitter, som er knyttet til svampens sporer.

# Litteratur

- Adan, O.C.G. (1994)  
On the Fungal Defacement of Interior Finishes.  
Eindhoven Univ. of Techn.
- Broberg, O. (1994)  
Skimmelsvampe udsender irriterende stoffer.  
Ingeniøren, no. 46, 18. november.
- Brock, T.D. og M.T. Madigan (1991)  
Biology of Microorganisms.  
6. udgave. Prentice-Hall international, Inc., New Jersey.
- Bunch-Nielsen, T. (1994)  
Fugtskanning af tage.  
Byggeindustrien no. 8.
- Cooke, R.C. og J.M. Whipps (1993)  
Ecophysiologi of Fungi.  
Blackwell Scientific Publications, Cambridge.
- Croft, W.A., B.B. Jarvis og C.S. Yatawara (1986)  
Airborne Outbreak of Trichothecene Toxicosis.  
Atm. Environm., vol. 20, no. 3, 549-552.
- Filtenborg, O. og J.C. Frisvad (1980)  
A Simple Screening-Method for Toxicogenic Moulds in Pure Cultures.  
Lebensmittel. u. Technol. 13. 128-130.
- Filtenborg, O., J.C. Frisvad og J.A. Svendsen (1983)  
Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures.  
App. and Environm. Microbiol., Feb., Vol. 45, no. 2, 581-585.
- Flannigan, B. (1987)  
Comment: Mycotoxins in the Air.  
Intern. Biodet. 23: 73-78. Elsevier.
- Flannigan, B. (1992)  
Indoor Microbiological Pollutants - Sources, Species, Characterisation and Evaluation.  
H. Knöppel og P. Wolkoff (eds.)  
Chem., Microbiol., Health and Comfort Aspects of Indoor Air Quality  
State of the Art in SBS, 73-98.

- Garraway, M.O. og R.C. Evans (1984)  
Fungal Nutrition & Physiology.  
Wiley-Interscience Publication, New York.
- Gravesen, S., J.C. Frisvad og R.A. Samson (1994)  
Microfungi.  
1. edition, Munksgaard, København.
- Gravesen, S., P.A. Nielsen og T.O. Larsen (1994)  
Emissioner fra mikroorganismer. Delprojekt A.  
Sundhedsskadelige emissioner fra mikroorganismer, som angriber fugtskadede bygninger.  
Bygge- og Boligstyrelsen. København.
- Johanning, E. & Yang, C.S. (eds.) (1995)  
Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments  
Health Effects, Detection and Remediation  
Proceedings of the International Conference, Saratoga Springs,  
New York, Oct 6-7, 1994
- Larsen, T.O. & J.C. Frisvad (1994)  
A simple method for collection of volatile metabolites from fungi  
based on diffusive sampling from Petri dishes.  
J. Microbiol. Methods. 19: 297-305. Elsevier.
- Miller, J.D., A.M. Laflamme, Y. Sobol, P. Lafontaine  
og R. Greenhalgh (1988)  
Fungi and Fungal Products in some Canadian Houses.  
Intern. Biodet. 24: 103-120.
- Nikulin, M., A.-L. Pasanen, S. Berg og E.-L. Hintikka (1994)  
*Stachybotrys atra* Growth and Toxin Production in Some Buildings  
Materials and Fodder under Different Relative Humidities.  
App. and Environm. Microbiol., Sept., Vol. 60, No. 9, 3421-3424.
- Pasanen, A.-L., M. Nikulin, S. Berg og E.-L. Hintikka (1994)  
*Stachybotrys atra* Corda May Produce Mycotoxins In Respirator  
Filters in Humid Environments.  
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 55(1): 62-65.
- Samson, R.A., B. Flannigan, M.E. Flannigan, A.P. Verhoeff, O.C.G.  
Adan og E.S. Hoekstra (eds) (1994).  
Health Implications of Fungi in Indoor Environments.  
Air Quality Monographs, vol. 2., Elsevier, Amsterdam.
- Sorenson, W.G., D.G. Frazer, B.B. Jarvis, J. Simpson og  
V.A. Robinson (1987)  
Trichothecene Mycotoxins in Aerosolized Conidia of *Stachybotrys  
atra*.  
App. and Environm. Microbiol., June, Vol.53, No.6, 1370-1375.
- Suneson, A.-L. (1995)  
Volatile Metabolites from Microorganisms in Indoor Environments  
Sampling, Analysis and Identification (Thesis).  
Umeå University, Sweden.
- Tobin, R.S. et al (chairperson) (1987)  
Report of a Working Group: Significance of Fungi in Indoor Air.  
Canadian Journal of Public Health, vol.78, 2, S1-S32.



## Bilag 1

Uddrag af ing.stud. Randi  
Iversens rapport over eksamens-  
projekt udført på DTU

Alt laboratoriearbejde til delprojekt 1 er udført af Randi Iversen på Institutet for Bioteknologi (IBT), bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, som en del af hendes eksamensprojekt. I bilag 1 er medtaget metodebeskrivelse og resultater.

### Fremstilling og tilsåning af grundsubstrater

For at opnå så god en efterligning af gipsplader som muligt er der fremstillet grundsubstrater ud fra pulveriserede gipsplademasser leveret af producenter af to almindeligt forekommende typer gipsplader. Dermed blev der opnået en realistisk sammensætning af gipsmaterialet.

De to leverede gipsplademasser repræsenterer henholdsvis gipskartonplader (DA) og fibergipsplader (FI). Forskellen på de to typer er dels et stort indhold af cellulose i FI, dels at DA-plader fremstilles med et armeringslag af karton (cellulose) udenom og en minimal mængde cellulose i selve massen. Dog er der en lille smule stivelse i massen, der fungerer som lim mellem selve pladen og kartonet.

I 200 ml flasker fremstilledes en række gips-agar blandinger for begge typer med stigende gipskoncentration: 0,5-25 pct. w/v for DA. Koncentrationen for FI var 0,5-15 pct. w/v for at opnå den optimale konsistens af dyrkningsmediet, idet det af hensyn til analysens udførelse er vigtigt at bevare agarens elasticitet samtidig med, at der også skal kunne iagttages god vækst.

Dertil anvendtes 15 g agar/l (Agar, Bie & Berntsen, BBB 10030, SO-BI-Gel, Agar-Agar), dobbelt destilleret vand samt 1 ml ca. 1 pct. spormetal opløsning ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  og  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ).

Til forkogning af substraterne anvendes en Sanoclav.

Til autoklavering anvendes en autoklave af mærket Struers, og der autoklaveres i 15 min. ved 121 °C.

Der fremstilledes desuden en enkelt DA-blanding med tilsætning af 1,7 g meget findelt karton. Blandingen blev opvarmet og hældt over gipsen; pH i substraterne blev målt før og efter autoklavering, og der blev omrystet kraftigt mellem hver ophældning af ca. 20 ml substrat i 9 cm petriskåle.

### Podning

Da *Stachybotrys chartarum* producerer toksiske metabolitter fx satratoxin H, foregik al podning samt efterfølgende aflæsning i LAF-bænk. Al direkte kontakt med svampen blev så vidt muligt undgået fuldstændigt.

En uge før tilsåning af agarpladerne blev svampesporer fra et isolat af *Stachybotrys* (IBT nr. 14915) fra Institutet for Bioteknologi (IBT), Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, udtaget af kultursamlingen. Det ovennævnte isolat, der opbevares på silicagel, blev udpodet på oat meal agar og inkuberet ved 25 °C, i mørke. Fra den fremvoksede kultur blev der herefter fremstillet en sporesuspension med koncentration ca.  $10^7$ .

Agarpladerne blev herefter podet ved hjælp af trepunkts inokulering med den ovennævnte sporesuspension. Én upodet plade fungerede som kontrol. Pladerne blev inkuberet i 2 uger ved 25 °C i mørke. Svampewæksten blev bedømt visuelt efter 2 uger.

Al efterfølgende podning blev udført med trepunkts inokulering og efterfølgende inkubering ved 25 °C.

Tabel 1. Gipsmængder i agar for DA og FI, i % (w/v) og g/200 ml.

%	0,5	1	2	3	5	7	10	15	20	25
g	1,0	2,0	4,0	6,0	10,0	14,0	20,0	30,0	40,0	50,0

### Undersøgelse af fungicid tilsætning og forsøg med karton

På gipskartonplader fra producent nr. 1 består kartonlaget af genbrugs-karton. Kartonen angives at være uden imprægnering af nogen art, således at det antages, at cellulosen kan bruges som næringskilde direkte.

For at undersøge påstanden om manglende tilsætning af fungicid til kartonet, blev der udført forsøg med dyrkning af *Stachybotrys* på et substrat bestående af agar tilsat vand, spormetal opløsning og meget findelt karton (konfetti) svarende til overfladearealet af en petriskål.

Samme mængde karton blev ligeledes blandet i gipsagar med 15 pct. gips, for dels at kunne iagttage, hvorledes kartonen lægger sig i forhold til gipsen, der vides at bundfælde og dels for at kunne iagttage, om der også er væksthæmning herpå, såfremt der ikke kan iagttages vækst på den rene karton-agar blanding.

### Bestemmelse og justering af vandaktivitet

Vandaktiviteten er som kritisk parameter vigtig at få nøjagtigt bestemt.

Tiden for bestemmelse af  $a_w$  er i disse forsøg 90 min. for alle undersøgte plader.

$A_w$  bestemmes på alle første otte FI-blandinger, på DA-blandingerne med 15 pct. og 25 pct. samt på DA-blanding 15 pct. iblandet karton, benævnt 15k pct.

Til forsøget nedsættes vandaktiviteten til 0,96 ved hjælp af glycerol. Forsøget skal vise, om den anbefalede mængde glycerol netop giver den ønskede  $a_w$ -værdi. Endvidere undersøges, hvorvidt *Stachybotrys chartarum* kan udnytte glycerol som næringskilde.

$A_w$  bestemmes samme dag som substraterne podes eller hurtigst muligt derefter.

### Kemikalier og apparatur

Der anvendes glycerol p.a. (ca. 87 pct.), Merck,  $C_3H_8O_3$ ,  $M=92,10$  g/mol, 1 l = 1,23 kg. Til  $a_w$  på 0,96 opløses 17,34 g ad 100 ml substrat.

Til forsøget blev der afvejet 34,6857 g (ad 200 ml). (Jakobsen, M., O. Filtenborg og F. Bramsnæs: Germination and Outgrowth of the Bacterial Spore in the Presence of Different Solutes. Lebensm. - Wiss. u. Technol., vol.5, no.5, 159-162, 1972.)

Til  $a_w$  bestemmelse anvendtes en Novasina  $a_w$ -box (reg.nr. 08304, DTH-DIA H28 - levnedsmiddel), og der blev udført tredobbelt bestemmelse ved  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ . Forud for bestemmelsen blev apparatet kalibreret mod tilhørende standard 0,98 (82 pct. kaliumdichromat). Apparatet kan måle  $a_w$  mellem 0,8 og 1,0 g.

### Bestemmelse og justering af pH

Før og efter autoklaving af et substrat foretages måling af pH ved hjælp pH-meter af mærket Hanna Instruments, 8417.

Under forsøgene med fremstilling af grundsubstrater måles pH kun for én gips-agar blanding for både FI og DA, idet det antages at pH er koncentrationsuafhængig. Den valgte blanding er 5 pct. gips.

Efterfølgende laves tre ekstra DA-blandinger med henholdsvis 20 pct., 25 pct. gips samt 15k pct.

Herudover foretages indstilling af pH ved hjælp af henholdsvis 1 M HCl og 1 M NaCl til bestemte værdier før autoklaving for både FI og DA.

I faktorforsøget ønskes pH værdier på 5 og 7 - yderpunkter for vækst af *Stachybotrys chartarum*, og derfor indstilles pH forsøgsvis til værdier omkring 5 og 9 for at se, om der sker nogen væsentlig ændring efter autoklaving. pH blev endvidere justeret til basisk og surt miljø.

pH-værdien af gips opløst i dobbelt destilleret vand blev målt for henholdsvis DA og FI.

### Faktorforsøget

Anden del udføres som et partielt  $2^5$  faktorforsøg, hvor vandaktivitet ( $a_w$ ), temperatur, nitrat, celluloseindhold og salts (natriumchlorid) indvirkning på vækst og dannelse af specifikke metabolitter undersøges hos *Stachybotrys chartarum* dyrket på de udviklede gipsagarsubstrater. Flygtige specifikke metabolitter (mVOC) opsamles fra kulturer i petriskåle v.h.a. passiv diffusion på kulrør, og analyseres v.h.a. GC-MS. Ikke-flygtige metabolitter ekstraheres fra gips-agar plader og analyseres ved HPLC -DAD.

#### Forsøgsmodel og -design

Faktorforsøget udføres som et screeningsforsøg med det formål at identificere de eller den faktor, der bevirker væsentlige ændringer i vækst og dannelse af specifikke metabolitter, når de varieres. De undersøgte faktorer er vandaktivitet ( $a_w$ ), temperatur, celluloseindhold, nitrat og salt (NaCl).

Som værktøj anvendes MODDE (MODelling and DEsign), der er et pc-windows program, specielt udviklet til planlægning og evaluering af eksperimentelt arbejde. MODDE bygger på almindeligt anerkendte metoder i den statistiske forsøgsplanlægning (User's Guide, 1993).

Figur 1 giver en oversigt over det valgte grundlag for faktorforsøget. Den valgte screeningsmodel er lineær med interaktioner.

Forsøget er designet som et partielt  $2^k$ -faktorforsøg, således at alle hovedvirkninger og 2-faktorvekselvirkninger kan estimeres "rent"

Maximum Runs	20
Objective	Screening
Model	Interaction
Design	Frac Fac Res V+
Runs in Design	16
Centrepoints	4
Replicates	0
N = Actual Runs	20

Figur 1. Oversigt over faktorforsøgets valgte grundlag.

(Resolution V+). Alle 2-faktorvekselvirkninger formodes at være forskellige fra nul. En vekselvirkning kan fortolkes som et mål for, i hvor høj grad virkningen af en niveauændring af den ene faktor, med fastholdt niveau af den anden faktor, afhænger af den anden faktors niveau.

Det samlede antal mulige hovedvirkninger og 2-faktorvekselvirkninger fås af:

$$\frac{k(k+1)}{2}$$

$$\text{For } k = 5, \text{ fås } \frac{5 \cdot (5+1)}{2} = 15.$$

Den partielle  $2^k$ -faktorstruktur konstrueres ud fra en fuldstændig  $2^p$ -faktorstruktur, hvor  $2^p$  betegner antal behandlinger. Det gives at  $\frac{k(k+1)}{2} < 2^p$ , opfyldes for  $p = 4$  svarende til 16 behandlinger.

Dette kaldes en  $\frac{1}{2} 2^5$  faktorstruktur (Brøndum & Monrad, 1988).

Screeningsmodellen kan beskrives ved

$$\text{Model (1): } E(Y_{x_1, x_2, \dots, x_5}) = \alpha_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_1 x_2 + \beta_7 x_1 x_3 + \beta_8 x_1 x_4 + \dots + \beta_{14} x_3 x_5 + \beta_{15} x_4 x_5,$$

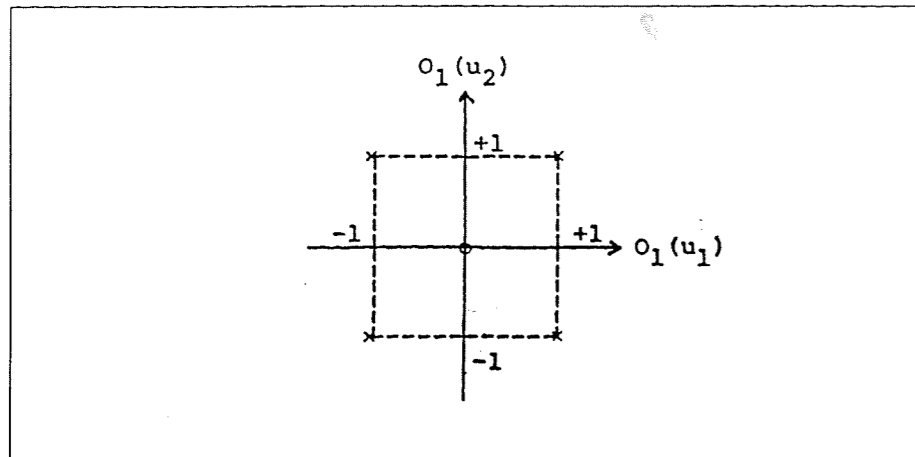
hvor  $x_n$  betegner variableerne i forsøget.

Modellen ønskes testet og estimeret ud fra en antagelse om at responsets middelværdi er en lineær funktion i hver variabel.

Hvis modellen indeholder kvadratiske led, har det sædvanligvis anvendte F-test, baseret på et forsøg med en  $2^k$ -faktorstruktur, ingen styrke, d.v.s. model (1) kan ikke testes mod en alternativ model (2), fx som angivet nedenfor.

$$\text{Model (2): } E(Y_{x_1, x_2, \dots, x_5}) = \alpha_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_1 x_2 + \beta_7 x_1 x_3 + \beta_8 x_1 x_4 + \dots + \beta_{14} x_3 x_5 + \beta_{15} x_4 x_5 + \beta_{16} x_1^2 + \beta_{17} x_2^2.$$

For at afhjælpe dette forhold suppleres behandlingerne i en  $2^k$ -faktorstruktur med en centerpunktsbehandling. Centerpunkter bruges til test af om modellen er lineær eller om den indeholder kvadratiske led i de variable. Brugen kan illustreres v.h.a. nedenstående figur 2.



Figur 2. Illustration af  $2^k$ -faktorstruktur med centerpunkt. O = ortogonalt polyn., x =  $2^k$  behandlinger, o = centerpunktsbehandling.

Kilde: Brøndum & Monrad, 1988.

Denne struktur kaldes en partiel  $2^k$ -faktorstruktur med centerpunktsbehandling.

Der medtages 4 centerpunkter - 2 for hvert grundsubstrat, svarende til en gentagelse af centerpunktsbehandlingen i samme punkt.

Der udføres kun én gentagelse af hver behandling. Figur 3 viser forsøgsmodellen, og figur 4 angiver forsøgets design.

	Abbreviated	Full Name
1	Cst	Constant
2	va	vandaktivi
3	te	temperatur
4	ni	nitrat
5	sa	salt
6	ce	cellulose
7	va*te	vandaktivi*temperatur
8	va*ni	vandaktivi*nitrat
9	va*sa	vandaktivi*salt
10	va*ce	vandaktivi*cellulose
11	te*ni	temperatur*nitrat
12	te*sa	temperatur*salt
13	te*ce	temperatur*cellulose
14	ni*sa	nitrat*salt
15	ni*ce	nitrat*cellulose
16	sa*ce	salt*cellulose

Figur 3. Forsøgsmodel. Hovedvirkninger og 2-faktorvekselvirkninger.

## Faktorer

De ovennævnte faktorer er alle faktorer, der formodes at have betydning for svampens vækst. De undersøges på lavt henholdsvis højt niveau, hvor niveauerne tilstræbes at repræsentere yderpunkter i en relevant forsøgsramme.

Alle de betragtede faktorer er kvantitative, og det vides ikke, hvilke faktorer der eventuelt vekselvirker med hinanden.

Faktorer samt niveauer ses af nedenstående tabel 2.

Tabel 2. Oversigt over faktorer og niveauer.

Faktor	Lavt niveau	Højt niveau	Centerpunkt
$a_w$	0,96	0,98-0,99 a)	0,97
Temperatur	20 °C	30 °C	25 °C
NaNO <sub>3</sub>	0 %	1 %	0,5 %
NaCl	0 %	5 %	2,5 %
Cellulose	-1 b)	1 b)	Se b)

Forklaringer til tabellen:

- Højt niveau for  $a_w$  er angivet upræcist, idet det er grundsubstraternes egen  $a_w$ -værdi, der bruges som højt niveau. Grundsubstraternes  $a_w$ -værdier er lidt forskellige, jævnfør fremskridtsrapportens  $a_w$ -resultater: FI: 0,982 og DA: 0,987.
- Mængden af cellulose i grundsubstraterne er irrelevant, idet det vides, at der er forskel i celluloseindholdet, og det er netop denne forskel, der er interessant. Af hensyn til MODDE's design og analyser repræsenteres DA og FI ved henholdsvis -1 og 1. Centerpunkter angives som -1 og 1, to for hvert grundsubstrat.

## Responsvariable

Alle responsvariable udtrykkes kvantitativt.

### Undersøgelse af væksten (Kolonidannelse)

Diameteren af de fremkomne kolonier vælges som den synlige indikator for den vækstpåvirkning *Stachybotrys chartarum* udsættes for i faktorforsøget. De fundne diameter vil derfor særskilt blive behandlet statistisk i forhold til de (signifikante) fundne faktorer.

### Undersøgelse af svampens stofskifteprodukter

Det totale areal af alle de toppe, der detekteres ved HPLC-DAD samt arealer af nogle enkelttoppe (areal X, areal Y, etc.) aflæses af chromatogrammerne fra den HPLC-analyse, der udføres på ekstrakter af gipsagar substraterne med de respektive behandlinger.

Det totale areal af de fremkomne toppe for hver behandling fortolkes som et udtryk for, hvor god svampen er til at producere specifikke metabolitter under de givne betingelser. En anden måde at udtrykke *Stachybotrys chartarum*'s evne til stofdannelse, er at bruge det samlede



	va	te	ni	sa	ce
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	+
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+
17	0	0	0	0	0 -
18	0	0	0	0	0 -
19	0	0	0	0	0 -
20	0	0	0	0	0 -

Figur 4. Forsøgsdesign. Lavt og højt niveau er repræsenteret ved - henholdsvis +. Centerpunktverdier kan ses af tabel 1.

antal toppe som et udtryk for diversitet i skimmelsvampens evne til stofdannelse.

Total-arealet vil ligeledes blive behandlet særskilt statistisk, og som kvantitativt udtryk for stofdannelse, vælges normalt enten areal under toppe eller tophøjde. Her vælges arealet, og valget begrundes senere i afsnittet om HPLC.

Total-arealet og diameteren formodes at kunne korreleres til hinanden, idet forsøg udført af Pasanen et al., (1994) viser, at toxinproduktionen ser ud til at hænge sammen med stærk vækst af svampen.

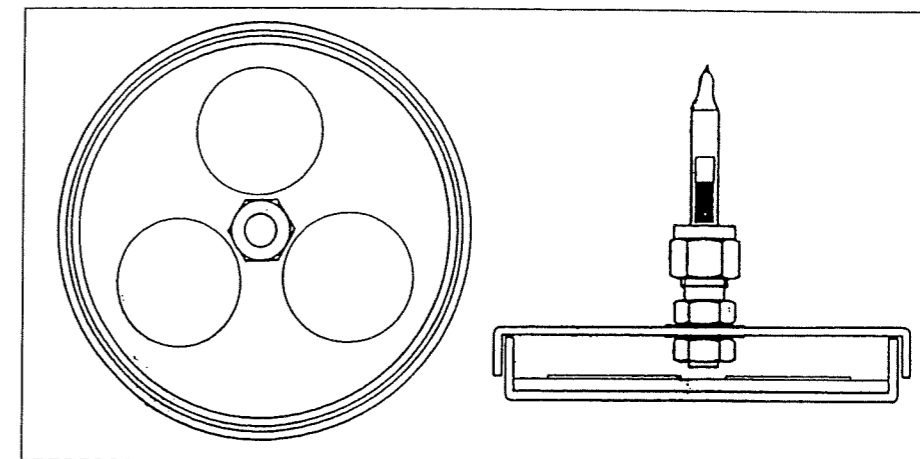
#### Enkelt arealer

Enkelt arealer medtages for at få mere detaljeret viden om faktorernes indvirkning på metabolitdannelsen. Identifikationen af de forskellige stoffer produceret for hver behandling, sker på grundlag af sammenligning af UV-spektre og retentionstider ( $t_R$ ) og index-behandlingerne imellem (Frisvad & Thrane, 1993(a)). Ud af alle detekterede toppe vil der blive udvalgt et antal toppe, der kan genfindes på flest behandlinger, til den videre analyse.

#### Påvisning af flygtige specifikke metabolitter

Flygtige stoffer (mVOC) opsamles på kulrør og analyseres v.h.a. gaschromatografi og massespektrometer (GC-MS) efter Larsen & Frisvad (1994).

Flygtige stoffer opsamles ved adsorption på aktivt kul ved diffusion. Petriskålens låg, hvori kulrøret monteres i en udboret klemfitting med teflon pakninger (Swagelok union), er udformet således, at adsorption nemmest finder sted, når koncentrationen af flygtige stoffer er høj tillige med placering af adsorbenten så tæt på emissionskilden som muligt. Kulrørene er kun åbne i den ende, der er inde i petriskålene, og



Figur 5. Opsamling af flygtige metabolitter v.h.a. diffusion. Et kulrør placeres i en klemfitting midt på petriskålens låg.

Kilde: Larsen og Frisvad, 1994. Modifieret.

enden af klemfittingen er afkortet for at reducere det volumen, den optager inde i skålen. Figur 5 viser skålens udformning.

#### Rengøring af låg

Låg og fittings med pakninger skilles ad, hvorefter fittings og pakninger kommer i en stor Erlenmeyer-kolbe. Der hældes 70 pct. ethanol på - skal lige dække. Kolben hensættes i ultralydsbad i 30 minutter. Lågene tørres grundigt af med 70 pct. ethanol indvendigt og udvendigt og atter indvendigt. Herefter samles låg og fittings igen og hvert enkelt indpakkes i autoklavepapir, og henstilles i varmeskab 4 timer ved 140 °C.

Glaspetriskålene afvaskes og skylles grundigt i destilleret vand, aftørres let og indpakkes i autoklavepapir, og henstilles ligeledes i varmeskab 4 timer ved 140 °C.

#### Montering af kulrør på låg

Kulrørene saves og knækkes og føres gennem en flamme før monteringen. Den overskårne ende af kulrøret skal flugte med enden af klemfittingen inden i låget før fastskrining. For at sikre luftudveksling mellem svamp og omgivelser anbringes en bøjet clips over skålens kant før låget sættes på. Skål med låg pakkes i en mikroperforeret pose. Herefter inkuberes skålene sammen med de øvrige plader ved de respektive temperaturer.

#### Podning

Til podning af plader er anvendt IBT isolat nr. 14915, der oprindeligt er isoleret fra en inficeret gipsplade.

En uge før podning er svampesporer fra en 20 pct. DA gips-agar plade opformeret ved stregpodning på oatmeal agar (OAT) og inkuberet ved 25 °C, i mørke. Herefter laves en sporesuspension med ukendt koncentration (mørk farve p.g.a. konidierne), og herfra podes med trepunkts stik. Pladerne inkuberes ved temperaturer som ovenfor angivet i oversigten over behandlinger. Svampevæksten bedømmes visuelt efter 3 uger.

$A_w$  bestemmes samme dag som substraterne podes eller hurtigst muligt derefter og opbevares indtil måling i tætte poser ved 0 °C.

## Kemikalier og apparatur

Samme type agar anvendes i alle substrater og i samme mængde, 15 g/l.

Data: Agar, Bie & Berntsen, BBB 10030, SO-BI-Gel, Agar-Agar.

Afvejede mængder karton: 2,9989 g < karton < 3,0036 g.

Der autoklaveres i 15 min. ved 121 °C.

Til forkogning anvendes en Sanoclav.

Til indstilling af vandaktivitet,  $a_w$ , anvendes glycerol p.a. (rent), Merck,  $C_3H_8O_3$ ,  $M=92,10$  g/mol, 1 l = 1,23 kg. Til  $a_w$  på 0,96 opløses 17,34 g ad 100 ml agar. Til forsøget afvejes 86,70 g (ad 500 ml) (Jakobsen et al., 1972). Til  $a_w$  på 0,97 anvendes halv mængde af ovenstående.

Tilsætning af salt: NaCl, Merck, p.a. Højt niveau, 5 pct. = 6,25 g/125 g gips. Afvejede saltmængder: 6,2504 g - 6,2545 g. Centerpunkt, 2,5 pct. = 3,125 g. Afvejede mængder: 3,1239 g - 3,1255 g.

Tilsætning af nitrat:  $NaNO_3$ , Merck, p.a. Højt niveau, 1 pct. = 1,25 g/125 g gips. Afvejede mængder: 1,2510 g - 1,2543 g. Centerpunkt, 0,5 pct. = 0,625 g. Afvejede mængder: 0,6248 g - 0,6262 g.

Til  $a_w$  bestemmelse anvendes en Novasina  $a_w$ -box, og der laves tredobbelt bestemmelse ved 25 °C  $\pm$  0,3 °C. Forud for bestemmelsen er apparatet kalibreret mod tilhørende standard 0,98 (82 pct. kaliumdichromat). Apparatet kan måle  $a_w$  mellem 0,8 og 1,0.

Til måling af pH anvendes et pH-meter af mærket Hanna Instruments, 8417.

Til ultralydsrensning anvendes et ultralydsbad af mærket Branson, 3200.

## Temperatures indflydelse på metabolitproduktionen

I denne del undersøges det, hvordan et pludseligt markant temperaturfald vil påvirke metabolitproduktionen.

Til forsøget anvendes DA og FI grundsubstrater, hvor der til DA substratet er tilsat 3,0 g karton pr. 500 ml substrat. Der fremstilles dobbelt portion af hvert grundsubstrat. Fremstillingen følger samme fremgangsmåde som beskrevet tidligere, inklusive glaspetriskåle til opsamling af flygtige metabolitter.

Pladerne podes med trepunktsstik og alle plader inkuberes 8 dage ved 25 °C i mørke, hvorefter halvdelen af pladerne, et hold af hvert grundsubstrat, stilles ved 5 °C i 2 uger i mørke.

Pladernes kolonidannelse aflæses efter sammenlagt 3 uger og der udføres analyser på HPLC og GC-MS analogt med delforsøg 2.

## Forsøg med fibergips

I sidste del podes *Stachybotrys chartarum* på 2 hele stykker fibergipsplade, savet til så de passer i to 14 cm glaspetriskåle.

Der fremstilles 250 ml dobbelt destilleret vand tilsat 0,25 ml spormetalopløsning, som autoklaveres sammen med de to petriskåle med fibergipsplade.

Herefter fremstilles to gange sporesuspension til podning ud fra de Ooat-meal-agar plader, der blev brugt til opformering til delforsøg 2 og 3.

Sporesuspensionen fordeles på toppen af gipspladerne. Der tilsættes 100 ml sterilt vand til hver petriskål. Skålene pakkes i perforerede poser og inkuberes ved 25 °C 4-5 uger. Gipspladerne inspiceres ca. hver 8. dag.

## Analysemetoder

*Påvisning af svampens faste metabolitter*

Følgende analysemetoder er brugt:

Tyndtlagschromatografi, TLC.

High-performance liquid chromatografi, HPLC.

Gaschromatografi, GC.

De instrumenter, der benyttes er udstyret med digitale elektroniske integratorer, der giver præcise bestemmelser af toparealer.

## Tyndtlagschromatografi, TLC

I TLC består den stationære fase af et tyndt lag af adsorberende partikler (sædvanligvis silicagel) bundet på en plade, og den mobile fase bevæger sig gennem dette lag ved hjælp af kapillar kræfter.

Den kvalitative analyse består i aflæsning af de pletter der er fremkommet på pladen efter elueringen. Hver plet repræsenterer en komponent, og er karakteriseret ved position på pladen samt farve. Positionen på pladen karakteriseres også som komponentens forsinkelsesfaktor,  $R_f$ , og beregnes som

$$R_f = d_R/d_M$$

hvor  $d_R$  er vandringen af pletten, og  $d_M$  er vandringen af væskefronten, begge målt fra startlinien. Plettens position angives som midtpunktet af pletten, hvis denne er symmetrisk ellers vælges midtpunktet af det område med størst intensitet (Skoog & Leary, 1992).

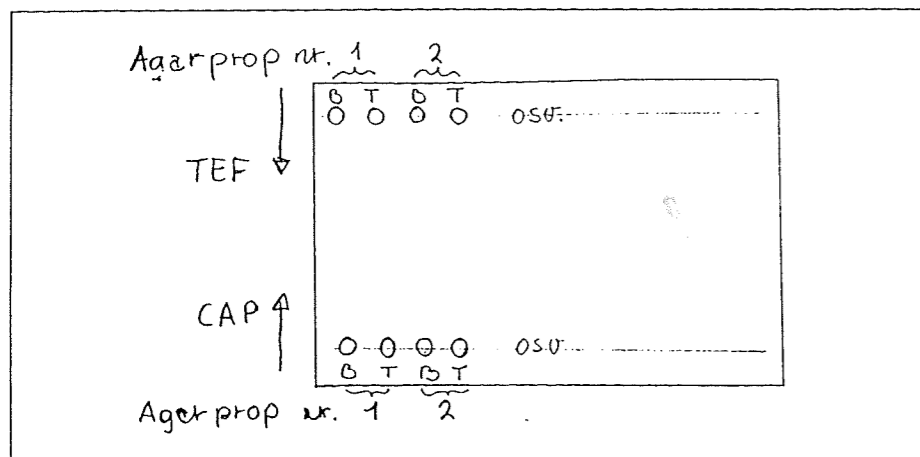
I dette projekt anvendes TLC som en for-screening for ikke-flygtige specifikke metabolitter til undersøgelse af, om der overhovedet produceres metabolitter med det fremstillede gips-agar substrat som næringsgrundlag, og i givet fald, om det ser ud til at være en for HPLC detekterbar mængde. TLC-pladen fremkaldes derfor ikke med forskellige metoder, men inspiceres udelukkende i dagslys samt UV-lys med bølglængderne 254 nm og 366 nm.

Der anvendes to standarder: Verrucaridin A (IBT st. nr. 164) og Roridin A (IBT st. nr. 141), begge fra Sigma.

Til denne screening anvendes gips-agar substrater fra delforsøg 1.

Bestemmelsen af specifikke metabolitter foretages ved hjælp af "agar-prop-metoden" (Filtensborg & Frisvad, 1980; Filtensborg et al., 1983).

Detektion af toxiner er baseret på TLC uden forudgående ekstraktion eller opkoncentrering. Mange mykotoxiner er extracellulære og diffunderer således ud i substratet, men mange toxiner findes også bundet i eller på konidierne og kaldes intracellulære. Der screenes sædvanligvis for begge typer toxiner samtidigt på samme TLC-plade. Proceduren er næsten ens for de to typer. For begge procedurer gælder



Figur 6. Illustration af agar-prop metoden.

det, at substratpropperne udtages af svampekulturen så tæt ved centrum som muligt.

De extracellulære toxiner overføres til TLC-pladen ved at placere bunden af substratproppen direkte på pladen. Proppen fjernes fra pladen så snart en væskefront kan iagttages, hvilket sker inden for få sekunder.

De intracellulære toxiner overføres ved at væde myceliet på en ny prop med én dråbe methanol-chloroform opløsning (1:2). Metabolitterne bliver ekstraheret i løbet af få sekunder, og mens myceliet endnu er vådt, placeres det direkte på TLC-pladen, og fjernes så snart en væskefront viser sig.

Methanol-chloroform-blandingens ekstraktions effektivitet kan tilskrives det polære opløsningsmiddel (methanol) evne til at bryde protein-lipid-bindingerne i membranerne ved at denaturere proteinerne. Det mindre polære opløsningsmiddel (chloroform) hjælper med at opløse lipiderne.

For at sikre en god adskillelse af metabolitter under elueringen, må de afsatte pletter ikke overstige en udstrækning på 5-8 mm i diameter. Ved lav koncentration/fortyndede prøver kan flere propper afsættes oven i samme punkt. Figur 6 illustrerer metoden, hvor der skiftevis placeres en prop fra top og bund af samme svampekultur ved siden af hinanden, men også i hver sin side af pladen af hensyn til fremkaldelsen, hvortil der anvendes to forskellige eluenter. Pladen elueres først i CAP (chloroform/acetone/propan-2-ol (85/15/20)) i 13 minutter, dernæst i TEF (toluen/ethylacetat/formic acid (90pct.) (5/4/1)) i 12 minutter efter ca. 10 minutters pause. Pladen står til sidst til afdampning i stinkskabet mindst 30 minutter før aflæsning foretages (Filtenborg & Frisvad, 1980; Filtenborg et al., 1983; Inst. for Biot., 1992).

Der laves tre chromatografplader ud fra substraterne i delforsøg 1 - en stor og en lille plade for DA samt en stor plade for FI. På den store DA-plade anbringes propper fra gips-agar-blandingerne med 3, 5, 7, 15, 1, 20, 25 pct. gips samt 25 pct. kontrolplade. 15 pct. blandingen er medtaget to gange, idet gips-agar-blandingerne er fremstillet ad to omgange.

Der påføres 2 propper i hvert punkt. Standarder afsættes på midten af pladen, hvor et hårrør tømmes én gang for hver standard, svarende til påsætning af ca. 5 µl standardopløsning.

På den lille plade anvendes kun propper fra 25 pct. blandingen, med 5 propper påført oven i hinanden. Dette gøres for at se, hvor meget stærkere et evt. respons vil være i forhold til intensiteten af 2 propper.

På FI-pladen anbringes propper fra 5, 7, 10 og 15 pct. gips samt standarder. Disse koncentrationer vælges fordi disse plader ikke var tørre og med tydelig vækst på.

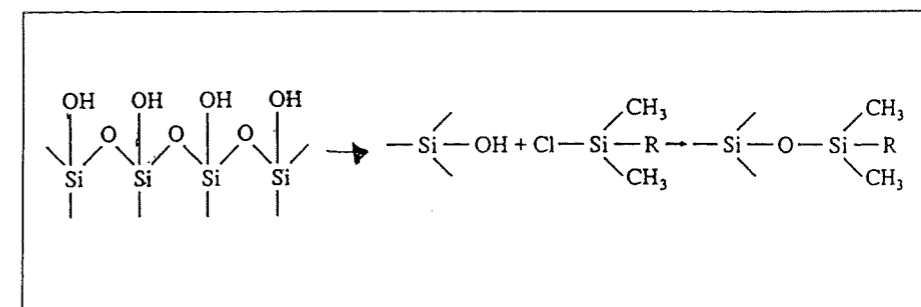
#### Kemikalier og apparatur

TLC-plader: Merck, DC-Fertigplatten, kiselgel 60, u. fluorescens-indikator, Art. nr. 5721 og 5724.

Ekstraktionsvæske: Methanol HPLC gradient grade, Merck 6007, Chloroform.

#### High-performance væskechromatografi, HPLC

En grundigere analyse af de ikke-flygtige metabolitter udføres efter Frisvad (1989). Her anvendes omvendt-fase high-performance væskechromatografi (HPLC), med diode array UV-VIS detektor.



Figur 7. Dannelse af siloxaner - kolonnemateriale. R-grupper er ofte langkædede hydrocarboner, fx C<sub>8</sub> eller C<sub>18</sub> kæder.

Kilde: Skoog & Leary, 1992.

#### Teori

Den mest udbredte form for væskechromatografi er bundet-fase fordelingschromatografi. Overfladen af hydrolyserede silicium partikler (3-10 µm i diameter), giver ved reaktion med en organochlorosilan, siloxaner, der er den mest anvendelige bundet-fase "coating". Figur 7 viser et eksempel på dannelse af en siloxan. R repræsenterer en alkylgruppe eller en substitueret alkylgruppe. En bundet-fase pakning er karakteriseret som omvendt-fase, når "coatingen" er upolær, d.v.s. at den stationære fase er upolær. Siloxanens R-grupper er da ofte langkædede hydrocarboner, fx C<sub>8</sub> kæder (*n*-octyl) eller C<sub>18</sub> kæder (*n*-octyldecyl).

Oftentimes vand, methanol eller acetonitril som mobil fase. Den mobile fase pumpes gennem kolonnen under højt tryk, fx 400 bar (4 · 10<sup>7</sup> Pa). Til dette anvendes mest almindeligt reciprocierende pumper.

I omvendt-fase metoden kommer de mest polære komponenter ud først, og hvis polariteten af den mobile fase øges, forlænges ligeledes elueringstiden.

Gradient eluering bevirker en effektiv adskillelse af de mange forskellige metabolitter, der ofte produceres i stort og varieret antal. Samtidigt fås en kort separationstid. Ved gradient eluering anvendes to (eller flere) solventer, der er meget forskellige m.h.t. polaritet. Forholdet mellem solventerne varierer under elueringen efter et bestemt mønster enten til at foregå kontinuerligt eller i en række trin.

Den mest anvendte injektions-metode er at indføre prøven via en "loop", der kan indeholde et bestemt volumen. Al overskydende prøve, ledes til spildbeholder (Skoog & Leary, 1992).

I disse analyser standardiseres retentions data v.h.a. alkylphenoner, der er en homolog serie af stoffer med faldende polaritet. Alkylphenon indexet af en metabolit (RI) beregnes v.h.a. følgende ligning:

$$RI = \frac{(T_{sm} - T_{p1})\Delta z \cdot 100}{T_{p2} - T_{p1}} + z \cdot 100$$

hvor  $T_{sm}$  = retentionstid af metabolitten,  $T_{p1}$  = retentionstiden af den alkylphenon, der elueres før metabolitten,  $T_{p2}$  = retentionstiden af den alkylphenon, der elueres efter metabolitten,  $Z$  = antal carbon atomer i alkylphenonen, der elueres før og  $\Delta z$  = forskellen mellem antal carbon atomer af alkylphenonerne, der elueres før og efter metabolitten (Frisvad, 1989).

Til detektion af de specifikke metabolitter anvendes en fotodiode-array detektor, der er en "multi-channel" detektor, der optager spektre v.h.a. elektrisk scanning on line. Spektrale data indsamles og gemmes for hver top, som den ser ud i det øjeblik, den forlader kolonnen. Optagelse af et helt spektrum sker på ca. 1 sek.

Til degasning af solventer bruges en inert gas, fx helium. Degasningen foregår v.h.a. gennembobling, der bevirker en udrivning af eventuelle opløste gasser, fx ilt eller nitrogen.

#### Ekstraktion

For hver behandling kommes indholdet af 10 petriskåle med svampekultur i tredobbelt Stomacher polyethylen-poser og ekstraheres med 75 ml chloroform/methanol (2:1) samt 75 ml ethylacetat + 1 ml myresyre. Derefter stomaches i 4 min., og væsken i posen filtreres gennem et fase-separationsfilter ned i en rundbundet kolbe, og den organiske fase afdampes *in vacuo* ved 38 °C på rotationsfordamper. Den inddampede prøve tilsættes 1 ml methanol, og der omrystes forsigtigt til mest muligt er opløst, hvorefter ekstraktet overføres til et præparatglas. Der tilsættes atter 1 ml methanol, der omrystes, og ekstraktet overføres til præparatglasset. Til sidst tilsættes 1 pasteur pipette (ca. 1,5 ml) petroleum-benzin til præparatglasset, og der omrystes grundigt. Ekstrakterne stilles i fryser ved -20 °C, og der kan udtages prøver fra den nederste fase dagen efter (Frisvad & Thrane, 1993(b)).

Efter frysning udtages prøve fra den nederste fase v.h.a. en pasteur-pipette og ekstraktet kommes ned i en engangssprøjte til filtrering ned i glas (vials).

#### Måling

Først fremstilles eluenterne A: filtreret vand og B: filtreret acetonitril tilsat 100 µl TFA, som derefter degasses ca. 10 min. Alle ekstrakterne samt alkylphenonblanding sættes i autosampleren og HPLC'en startes ifølge vejledning (IBT vejledning). Efter endt kørsel skylles HPLC'en på begge kanaler med methanol.

#### Analysespecifikationer

Der anvendes en HP 1090 liquid chromatograph, med to pumper og diode-array UV-VIS-detektor med måling af 3 faste bølgelængder (254 nm, 351 nm og 450 nm) hver gang en top detekteres ved 225 nm. Der elueres efter nedenstående gradientsystem:

Tid (min)	Solvent A	Solvent B
0,01	90,0%	10,0%
30,00	50,0%	50,0%
40,00	10,0%	90,0%
49,00	90,0%	10,0%
50,00		stop

Ovntemperatur: 40,0 °C

Flow rate: 2,000 ml/min

Injektionsmængde: 10 µl

Kolonne: 100 mm · 4 mm Nucleosil 5-µm C18, omvendt fase.

#### Kemikalier og apparatur

Til ekstraktionen anvendes følgende:

En Colworth Stomacher 400; methanol, HPLC gradient grade, Merck 6007; chloroform; ethylacetat, destilleret, Inst. for org. kemi/DTU; Myresyre, Merck 264; Petroleum-benzin, Merck 1774; Whatman fase-separationsfilter, 1PS, silikonebehandlede 185.

Til filtrering af ekstrakter før kørsel:

Sartorius Minisart, SRP 15, porestr. 0,45 samt 2 ml engangssprøjter. Eluenter:

Filtreret, dobbelt destilleret vand; filtreret acetonitril, HPLC grade, Merck 14291; TFA, trifluoreddikesyre, Merck 8262; methanol, HPLC gradient grade, Merck 6007.

Til degasning bruges helium.

#### Påvisning af flygtige metabolitter

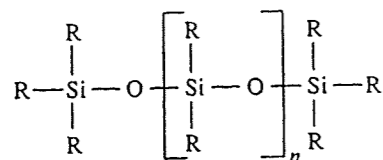
Flygtige stoffer (mVOC) opsamles på kulrør og analyseres v.h.a. gaschromatografi og massespektrometer (GC-MS) efter Larsen & Frisvad (1994). Til dette forsøg anvendes en gaschromatograf, der er direkte tilkoblet et quadropol massespektrometer, således at komponenterne efter separation på kolonnen direkte kommer ind i ionisationskammeret på spektrometret. Komponenterne omdannes termisk til positivt ladede ioner, der derefter accelereres ind i masseanalytoren. Princippet i detektionen er baseret på komponenternes karakteristiske spektre ved dekomponeringen. Adskillelsen sker således at



kun positivt ladede ioner/ionfragmenter detekteres ud fra deres masse/ladnings ( $m/z$ ) forhold.

De fremkomne spektre sammenlignes med spektre i den tilhørende database til identifikation af flygtige stoffer.

Mængder af de flygtige stoffer findes ved sammenligning med en intern standard.



Figur 8. Dimethyl siloxan grundstruktur af stationær fase. R-grupper kan fx være methyl,  $-CH_3$  eller phenyl,  $-C_6H_5$ .

Kilde: Skoog & Leary, 1992.

Polariteten af den stationære fase vælges efter polariteten af de komponenter, der skal analyseres, og polariteten bestemmes af den type funktionelle grupper, der typisk sættes på en polydimethyl siloxan struktur, se figur 8. R repræsenterer her methyl-grupper ( $-CH_3$ ), hvis en relativ upolær stationær fase ønskes, mens fx substitution med phenyl-grupper ( $-C_6H_5$ ) øger polariteten.

Tykkelsen af den stationære fase (filmen) har betydning for kolonnens kapacitet og hvor godt stofferne holdes fast. Til meget flygtige stoffer anvendes tykke film, der holder stofferne fast længere tid, og giver derfor mere tid til en adskillelse.

#### Ekstraktion

Stofferne desorberes fra rørene ved eluering med 1,5 ml diethylether hvorefter vials med ether og flygtige stoffer stilles i fryser ved  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  til udskillelse af vand. Prøverne opbevares i øvrigt ved  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Før analyse dekanteres etherfasen fra eventuelle iskrystaller og etherfasen opkoncentreres til ca.  $10\text{ }\mu\text{l}$  under en svag  $N_2$  strøm. Herefter kan ekstrakterne analyseres.

#### Måling

Forud for analyse af prøver foretager massespektrometret automatisk en kalibrering, en "standard spektra autotune" med stoffet PFTBA, pentafluortributylamin. Hvis forholdet mellem tre karakteristiske toppe ligger inden for givne intervaller er apparatet klar til analyse.

Til identifikation af komponenter, er massespektre af de opsamlede mVOC'er sammenlignet med spektre i NIST PBM library (ca. 75.000 spektre).

#### Analysespecifikationer

Der anvendes en HP 5890 serie II gaschromatograf tilkoblet en HP 5972 masse selektiv detektor (quadropol massespektrometer). Der scannes i området 35-350 amu, svarende til 2,2 scan per sek.

Der anvendes en 50 m  $\cdot$  0,20 mm HP Ultra 2 (5 pct. Ph Me Silicone) kolonne, med 0,32  $\mu\text{m}$  filmtykkelse.

Til analysen anvendes temperatur-programmering:

Starttemperaturen på  $35\text{ }^\circ\text{C}$  holdes i 2 min., hvorefter temperaturen øges med  $6\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . indtil en sluttemperatur på  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , som holdes i 5 min.

Der injiceres manuelt  $1\text{ }\mu\text{l}$  v.h.a. en mikrosprøjte, og der analyseres splitless i 45 sek., hvilket giver maksimal følsomhed for detektion.

Herefter "purges" med 40 ml helium per min.

#### Kemikalier og apparatur

Kulrør: SKC 22601, Diethylether, Merck 929. Som bæregas bruges helium, renhed 5,5.

Til on line optagelse af spektre og bibliotekssøgning er anvendt HP udstyr og software: G1033A NIST PBM Library, G1036A NIST Structures Database og G1034C MS Chemstation software på en HP Vectra XMZ, 4/66i computer.

#### Statistiske metoder

Den statistiske behandling foretages v.h.a. MODDE, og der anvendes multipel lineær regression (MLR) til tilpasning af data til den valgte lineære model med interaktioner. Med MLR skaleres og centrerer designets matrix v.h.a. orthogonal skalering (default).

Der udskrives variansanalysetabeller (ANOVA), der viser fordelingen af den totale variation for det valgte respons,  $SS_{\text{total}}$  opdelt på variation fra regressionsmodellen og variation p.g.a. residualer. Residualer er et udtryk for forskellen mellem de observerede værdier og de tilpassede (predikterede) værdier.

Ligeledes udskrives tabeller med de beregnede (empiriske) koefficienter på baggrund af skalerede og centrerede data.

Modellen reduceres for hvert respons, således at ikke-signifikante kombinationer fjernes ( $p > 0,05$ ), hvorefter der beregnes nye koefficienter og ny ANOVA-tabel.

Der laves normalfordelingsplot (Nplot) af residualer til identifikation af enkelte outliers eller evt. grupper, der afspejler enten en dårlig model, et dårligt udført forsøg eller at responsene måske bør transformeres. Modellen for responset antages at være god, når residualerne fordeler sig efter en ret linie uden grupperinger eller outliers. Der laves også plot af residualer mod predikterede værdier til illustration af samme problematik som nævnt ovenfor.

Der laves kontur plot for nogle effekter; specielt ses på diameter som respons.

ANOVA-tabellerne giver data til test af om den tilpassede model er lineær: fra fuld model fås  $SAK_{\text{error}} = SAK_0$

Fra reduceret model fås  $SAK_{\text{res.}} = SAK_{\text{error}} - SAK_0$ , og med  $f_{\text{res.}} = f_{\text{error}} - f_0$ . Dette giver  $s_{\text{res.2}} = SAK_{\text{res.}}$

$f_{\text{res.}}$

Testning af modellen bliver da:  $F = \frac{s_{\text{res},2}}{s_{02}}$

Hvis den lineære model forkastes, må den enten optimeres eller der må udføres supplerende undersøgelser.

## Bilag 2

### Skema til bygningsgennemgang

BYGNING:  
ADRESSE:

Dato:  
Signatur:

Bygningsbeskrivelse

Alder:  
Etage:  
Kælder:  
Anvendelse:  
Tagform:  
Tagbeklædning:  
Facadebeklædning:  
Vedligeholdelsesstandard:  
Udvendig reovering:  
Årstal for reovering:

Lokalebeskrivelse

Placering i bygning:  
Anvendelse:  
Loft:  
Facadevæg:  
Indvendige vægge:  
Gulv:  
Vinduesglas:  
Opvarmning:  
Vedligeholdelsesstandard:  
Indvendig reovering:  
Årstal for reovering:

Ventilation

Alder:  
Recirkulation:  
Befugter:  
Køleflade:  
Varmeblade:  
Indblæsningsluftmængde:  
Luftskifte:  
Vedligeholdelsesstandard:  
Reovering:  
Årstal for reovering:

Materiale

Prøve nr:  
Fugtbelastning:  
Årsag:  
Periode for fugtbelastning:  
Skimlet:  
Udbredelse  
Karakter:

Prøvetagningssted

Placering:  
Konstruktionsopbygning:

Dyrknings svar

Svampe:  
Omfang:

Bemærkninger

Skitse

## Bilag 3

Dyrknings svar fra ALK,  
Allergologisk Laboratorium  
København



**Dyrkningssvar**

Mikrobiologisk undersøgelse af materialer ved hjælp af aftryksplader

Påvisning af mikrosvampe

---

 SBI-Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 1

 Prøvetagningsdato : Maj 1995
 

---

Prøve 1:	<u>Aftryk af glasvæv (malet)</u> Penicillium chrysogenum Ulocladium oudemansii	dominerende	Massiv vækst
Prøve 2:	<u>Aftryk af linoleum</u> Sporobolomyces sp. Penicillium chrysogenum Penicillium palitans Rhodotorula sp.	dominerende	Massiv vækst
Prøve 3:	<u>Aftryk af maling fra væg</u> Candida sp. Scopulariopsis brevicaulis		Moderat vækst
Prøve 4:	<u>Aftryk af papirtapet</u> Penicillium chrysogenum		Massiv vækst
Prøve 5:	<u>Aftryk af malet lærred fra isoleringskappe</u> Chaetomium sp.		Moderat/massiv vækst
Prøve 6:	<u>Aftryk af tyk pap fra isoleringskappe</u> Chaetomium sp.		Massiv vækst
Prøve 7:	<u>Aftryk af rullemåttepapir fra isoleringskappe på tank</u> Chaetomium sp.		Massiv vækst

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 1

 Prøvetagningsdato : Maj 1995
 

---

Prøve 8:	<u>Aftryk af blød masonit</u> Phoma sp. Cladosporium sp. Sporobolomyces sp.	dominerende	Massiv vækst
Prøve 9:	<u>Aftryk af linoleum på trægulv</u> Penicillium chrysogenum Acremonium sp. Ulocladium oudemansii	dominerende	Moderat vækst
Prøve 10:	<u>Aftryk af glasvæv på masonitplade</u> Aspergillus versicolor Penicillium chrysogenum		Massiv vækst
Prøve 11:	<u>Aftryk af bagside af linoleumsvæv</u> Aspergillus sp., cf. terreus Mucor plumbeus	dominerende	Massiv vækst



SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 4  
Prøvetagningsdato : Juni 1995

Prøve 21A:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Stachybotrys chartarum	dominerende	
	Acremonium sp.		
	Chaetomium sp.		
	Ulocladium oudemansii		
Prøve 21B:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Stachybotrys chartarum		
	Ulocladium oudemansii		
Prøve 22A:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Stachybotrys chartarum	dominerende	
	Penicillium chrysogenum		
Prøve 22B:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Stachybotrys chartarum	dominerende	
	Ulocladium oudemansii		
Prøve 23A:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Ulocladium oudemansii	dominerende	
	Aspergillus sp.		
Prøve 23B:	<u>Aftryk af gipsplade</u>		Massiv vækst
	Stachybotrys chartarum	dominerende	
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Aspergillus sp.		
	Chaetomium sp.		
	Ulocladium oudemansii		

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 5  
Prøvetagningsdato : Juli 1995

Prøve 24:	<u>Aftryk fra malet hessiantapet</u>		Massiv vækst
	Mucor plumbeus	dominerende	
	Penicillium chrysogenum	dominerende	
	Gær sp.		
	Rhodotorula sp.		
	Mycothypha sp.		
Prøve 25:	<u>Aftryk fra akustikfolie fra Dämpaprofil uden isolering</u>		Massiv vækst
	Penicillium flavigenum	dominerende	
	Gær sp.		

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 6

Prøvetagningsdato : Juli 1995

---

Plade 25A: Aftryk fra karlitloftsplade Massiv vækst  
Trichoderma harzianum dominerende  
Gær sp.  
Penicillium sp.

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 7

Prøvetagningsdato : Juli 1995

---

Plade 26: Aftryk fra crepepapir fra isoleringsmätte Massiv vækst  
Penicillium corylophilum dominerende  
Acremonium sp.  
Gær sp.  
Stachybotrys chartarum

Plade 27: Aftryk fra træbrædder Massiv vækst  
Gær sp. (mørk) dominerende  
Acremonium sp.  
Aspergillus sp.  
Gær sp. (hvid)  
Penicillium sp.  
Stachybotrys chartarum

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 8  
Prøvetagningsdato : August 1995

---

Plade 28:	<u>Aftryk fra træ fra loft</u>		Massiv vækst
	Aspergillus ustus	dominerende	
	Acremonium sp.		
	Penicillium sp.		
	Phoma sp.		
	Rhodotorula sp.		
	Trichosporon pullulans		

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 9  
Prøvetagningsdato : September 1995

---

Plade 29A:	<u>Aftryk fra tagplade med tagpap (overside)</u>		Moderat/massiv vækst
	Trichoderma harzianum/viride		
Plade 29B:	<u>Aftryk fra tagplade med tagpap (underside)</u>		Moderat/massiv vækst
	Trichoderma harzianum/viride		
Plade 29C:	<u>Aftryk fra tagplade med tagpap (m.synlig svamp)</u>		Moderat/massiv vækst
	Trichoderma harzianum/viride	dominerende	
	Acremonium sp.		
	Aspergillus fumigatus		
	Gær sp.		
Plade 30:	<u>Aftryk fra alufolie (vådt)</u>		Massiv vækst
	Trichoderma harzianum/viride	dominerende	
	Acremonium sp.		
	Penicillium sp.		
	Verticillium sp.		



SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 10  
Prøvetagningsdato : Oktober 1995

Plade 31A:	<u>Aftryk fra gips</u> Chaetomium sp. Aspergillus sp. Penicillium sp.	dominerende	Massiv vækst
Plade 31B:	<u>Aftryk fra gipsrondel</u> Aspergillus niger Aspergillus sp. Paecilomyces sp. Penicillium sp.		Ringe vækst
Plade 32:	<u>Aftryk fra savsmuldstapet</u> Penicillium chrysogenum Aspergillus versicolor Aspergillus sp.	dominerende	Massiv vækst
Plade 33:	<u>Aftryk fra gulvbelægning m. træfiberplade</u> Paecilomyces variotii Aspergillus niger Aspergillus sp.	dominerende	Massiv vækst
Plade 34:	<u>Aftryk fra masonit</u> Aspergillus sydowii Chaetomium sp. Gær sp. Mucor spinosus Paecilomyces sp. Penicillium sp.		Massiv vækst

SBI Projekt : Mikroorganismer i vandskadede bygninger, sagsnr. F7-159

Prøvetagningssted : Bygning 11  
Prøvetagningsdato : Oktober 1995

Plade L1:	<u>Aftryk fra parketgulv, Hesten 14 (1.01)</u> Cladosporium herbarum Cladosporium sphaerospermum Alternaria alternata Penicillium sp. Trichosporon pullulans Myelia sterilia	dominerende	Massiv vækst
Plade L2:	<u>Aftryk fra tapet i korridor (6.01)</u> Alternaria alternata Cladosporium herbarum Cladosporium sphaerospermum Penicillium sp. Stemphylium sp.		Moderat vækst
Plade L3:	<u>Aftryk fra polystyrol sokkel (8.01)</u> Aspergillus versicolor Aspergillus sp. Paecilomyces sp.	dominerende	Massiv vækst
Plade L4A:	<u>Aftryk fra loftsfinér - sort side (8.02)</u> Aspergillus sydowii Aspergillus sp. Penicillium sp.	dominerende	Massiv vækst
Plade L4B:	<u>Aftryk fra loftsfinér - træside (8.02)</u> Aspergillus sydowii Aspergillus sp. Penicillium sp.		Ringe vækst

Bilag 4

Materialeskemaer

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR: 1

Bygningstype: Skole Opførelsesår: 1961

Lokale: Biologilokale (tagetage 3. sal)

Årsag: Utæt inddækning ved ovenlysvindue i tegltag

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Penicillium chrysogenum, dominerende, Ulocladium oudemansii

Bygningsdel: Skunkvæggen under tagvindue. Skunkvæggen er opbygget af forskalling, rørpuds, glasvæv og maling

Materialer: Malet glasvæv (malingstype er ikke fastlagt ved kemisk analyse)

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 2

Bygningstype: Skole Opførelsesår: 1954

Lokale: Elektronikum (tagetage, 3 sal)

Årsag: Ikke svejset fuger i linoleumsgulvbelægning, hvor rengøringsvand og vand fra utæthed ved ovenlysvindue i tegltag fra 1961 har kunnet trænge ned i den underliggende gulvkonstruktion

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Sporobolomyces sp., dominerende, Penicillium chrysogenum & P. palitans, Rhodotorula sp.

Bygningsdel: Gulvkonstruktionen har følgende opbygning: Betondæk, isolering (rullematte med papir), støbeasfalt, afretningsslag, klæber og gulvbelægning af linoleum

Materialer: Linoleumsgulvbelægning i baner uden svejste samlinger og med jute på bagsiden.

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

**MATERIALE NR.: 3** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1955

**Lokale:** Trapperum i kælderplan

**Årsag:** Utæthed ved afløb fra udslagsvask. Dårlig udtørningsmulighed (fugtig kælderydervæg)

**Skimmelsvampe:** Moderat vækst, Candida sp., Scopulariopsis brevicaulis

**Bygningsdel:** Kælderydervæg, teglsten med puds og maling

**Materialer:** Malingsbehandling, 3-lag på pudset teglstensvæg

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	3

**MATERIALE NR.: 4** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1930

**Lokale:** Specialklasse (tagetage, 3. sal)

**Årsag:** Utæt skotrende

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Penicillium chrysogenum

**Bygningsdel:** Dobbeltmur af teglsten med puds og tapet

**Materialer:** Papirtapet

**Opfugtningsperiode:** Formentlig langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	3

**MATERIALE NR.: 5** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1954

**Lokale:** Teknikrum i kælder

**Årsag:** Utæt vandtank og dermed fugtindtrængning i isolering. Vand på gulvet.

**Skimmelsvampe:** Moderat/massiv vækst, Chaetomium sp.

**Bygningsdel:** Tank med varmeisolering, rullemåtte med papir, pap, lærred og maling

**Materialer:** Lærred med maling

**Opfugtningsperiode:** Langvaring, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

**MATERIALE NR.: 6** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1954

**Lokale:** Teknikrum i kælder

**Årsag:** Utæt vandtank og dermed fugtindtrængning i isolering. Vand på gulvet.

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Chaetomium sp.

**Bygningsdel:** Tank med varmeisolering, rullemåtte med papir, pap, lærred og maling

**Materialer:** Trykt pap fra isoleringskappe

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6



**MATERIALE NR.: 7** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1954

**Lokale:** Teknikrum i kælder

**Årsag:** Utæt vandtank og dermed fugtindtrængning i isolering. Vand på gulvet.

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Chaetomium sp.

**Bygningsdel:** Tank med varmeisolering, rullematte med papir, pap, lærred og maling

**Materialer:** Papir fra isoleringskappe på tank

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
$\Sigma$ Potentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

**MATERIALE NR.: 8** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1930

**Lokale:** Depot/gang, 3. sal

**Årsag:** Vandindtrængning gennem tag ved skorsten

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Phoma sp., dominerende, Cladosporium sp., Sporobolomyces sp.

**Bygningsdel:** Loft: Blød masonite på gitterspær

**Materialer:** Blød masonite, blød imprægneret træfiberplade

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
$\Sigma$ Potentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

**MATERIALE NR.: 9** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1930

**Lokale:** Toiletrum, 3. sal

**Årsag:** Vand fra håndvask og fra vindue

**Skimmelsvampe:** Moderat vækst, *Penicillium chrysogenum*, dominerende, *Acremonium sp.*, *Ulocladium oudemansii*

**Bygningsdel:** Gulvkonstruktion: Trægulv med afretningslag, linoleumsbelægning

**Materialer:** Gulvbelægning: Linoleum med jute på bagsiden

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

**MATERIALE NR.: 10** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1930

**Lokale:** Klublokale, 3. sal

**Årsag:** Fugt fra tidligere jernvindue med 1 lag glas (nu udskiftet) i tegltag

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*

**Bygningsdel:** Skunkvæg med isolering. Blød masonite på træskelet

**Materialer:** Blød masonite med glasvæv og maling

**Opfugtningsperiode:** Tidligere opfugtning, der nu er udtørret

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

**MATERIALE NR.: 11** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1930

**Lokale:** Trapperum i kælder

**Årsag:** Indtrængning af grundfugt

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Aspergillus sp., cf. terreus, dominerende, Mucor plumbeus

**Bygningsdel:** Kældergulv af beton, asfalt og linoleum

**Materialer:** Jute fra linoleumsgulvbelægning

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

**MATERIALE NR.:12** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1963

**Lokale:** Gang

**Årsag:** Utæt tag ved inddækning mod mur

**Skimmelsvampe:** Moderat vækst, Chaetomium sp., dominerende, Penicillium sp.

**Bygningsdel:** Tagkonstruktion: Tagpap, brædder, spær/hulrum, mineraluld, akustikloft

**Materialer:** Mineraluldsstrimler fra akustikloft

**Opfugtningsperiode:** -

**Omfang af svampevækst:** 1 - 2 m<sup>2</sup>

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	> 4

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 13

Bygningstype: Skole Opførelsesår: 1963

Lokale: Gang

Årsag: Utæt tag ved inddækning mod mur

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Chaetomium sp., dominerende, Aureobasidium pullulans, Gær sp., Penicillium sp.

Bygningsdel: Tagkonstruktion: Tagpap, brædder, spær/hulrum, mineraluld, akustikloft

Materialer: Mineraluld

Opfugtningsperiode: -

Omfang af svampevækst: 1 - 2 m<sup>2</sup>

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	> 4

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 14

Bygningstype: Skole Opførelsesår: 1967/69

Lokale:

Årsag: Utæt tag p.g.a. dårlige samlingsdetaljer

Skimmelsvampe: Moderat vækst, Mucor plumbeus, Penicillium sp., Rhizopus stolonifer

Bygningsdel: Tagkonstruktion: Tagpap, træfiberplade, hulrum, mineraluld, aluminiumsfolie, spånplade, maling

Materialer: Spånplade

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	> 3

**MATERIALESKEMA**  
**MATERIALE NR.: 15**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1967/69

**Lokale:**

**Årsag:** Utæt tag p.g.a. dårlige samlingsdetaljer

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Sporobolomyces sp., dominerende, Cladosporium sp., cf. cladosporioides, Penicillium sp., Ulocladium chartarum

**Bygningsdel:** Tagkonstruktion: Tagpap, træfiberplade, hulrum, mineraluld, Aluminiumsfolie, spånplade, maling

**Materialer:** Aluminiumsfolie

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	> 4

**MATERIALESKEMA**  
**MATERIALE NR.: 16**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1967/69

**Lokale:**

**Årsag:** Utæt tag p.g.a. dårlige samlingsdetaljer

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Ulocladium chartarum, dominerende, Cladosporium sphaerospermum, Gær sp., Penicillium chrysogenum

**Bygningsdel:** Tagkonstruktion: Tagpap, træfiberplade, hulrum, mineraluld, aluminiumsfolie, spånpladse, maling

**Materialer:** Mineraluldsisolering

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	> 5



MATERIALE NR.: 17 **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Bibliotek **Opførelsesår:** 1972, renoveret 1983

**Lokale:** Musikbibliotek

**Årsag:** Utæthed ved tag, samlingsdetalje ved brystning

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Rhodotorula sp., dominerende, Alternaria alternata, Aureobasidium pullulans, Cladosporium sp., Penicillium chrysogenum, Ulocladium oudemansii

**Bygningsdel:** Nedhængt gipspladeloft i skinnesystem, Over det nedhængte loft er der et fladt (varmt) tag bestående af tagpap, betondæk (fugtigt), hulrum, nedhængt loft.

**Materialer:** Karton fra overside af gipskartonplader

**Opfugtningsperiode:** Langvarig over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:** ca. 0,5 m<sup>2</sup>

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

MATERIALE NR.: 18 **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Bibliotek **Opførelsesår:** 1972, renoveret 1983

**Lokale:** Musikbibliotek

**Årsag:** Utæthed ved tag, samlingsdetalje ved brystning

**Skimmelsvampe:** Moderat vækst, Paecilomyces lilacinus, dominerende, Fusarium sp., Gær sp.

**Bygningsdel:** Fladt (varmt) tag bestående af 3 lag pap, 100 mm mineraluld, 2 lag pap, polystyrenskum, beton(leca)dæk

**Materialer:** Mineraluld fra tagisolering (øverste lag)

**Opfugtningsperiode:** Langvarig over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 19

Bygningstype: Bibliotek      Opførelsesår: 1972, renoveret 1983

Lokale: Teatersal

Årsag: Utæt tagbelægning. Tagpappen var knækket. Den bløde træfiberplade, der var placeret lige under pappen, har ikke kunnet klare belastningen.

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Monilia sp., dominerende, Trichosporon sp., dominerende, Gær sp., Candida sp., Verticillium sp., Stemphylium sp.

Bygningsdel: Fladt tag bestående af tagpap, blød træfiberplade, mineraluld, tagpap, polystyrenskum, asfaltklæber, beton(leca)dæk

Materialer: Blød træfiberplade

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 20

Bygningstype: Bibliotek      Opførelsesår: 1972, renoveret 1983

Lokale: Teatersal

Årsag: Utæt tagbelægning. Tagpappen knækket. Den bløde træfiberplade, der var placeret lige under pappen, har ikke kunnet klare belastningen

Skimmelsvampe: Moderat vækst, Cladosporium sp., Trichosporon sp., Mycelia sterilia

Bygningsdel: Fladt tag, bestående af tagpap, blød træfiberplade, mineraluld, tagpap, polystyrenskum, asfaltklæber, beton(leca)dæk

Materialer: Mineralfiber måtte

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

MATERIALE NR.: 21 **MATERIALESKEMA**

Bygningstype: Børneinstitution **Opførelsesår: 1993**

Lokale: Trapperum i kælder

Årsag: Indtrængen af vand (utæt membran) fra terræn

Skimmelsvampe: *Prøve A:*  
 Massiv vækst, Penicillium chrysogenum, dominerende, Stachybotrys chartarum, dominerende, Acremonium sp., Chaetomium sp., Ulocladium oudemansii  
*Prøve B:*  
 Massiv vækst, Penicillium chrysogenum, dominerende, Stachybotrys chartarum, Ulocladium oudemansii

Bygningsdel: Dobbelt gipskartonpladevæg på stålskelet

Materialer: Malerbehandlet gips

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst: 50 x 200 cm

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

MATERIALE NR.: 22 **MATERIALESKEMA**

Bygningstype: Børneinstitution **Opførelsesår: 1993**

Lokale: Teknikrum i kælder

Årsag: Indtrængen af vand (utæt membran) fra terræn

Skimmelsvampe: *Prøve A:*  
 Massiv vækst, Stachybotrys chartarum, dominerende, Penicillium chrysogenum  
*Prøve B:*  
 Massiv vækst, Penicillium chrysogenum, dominerende, Stachybotrys chartarum, dominerende, Ulocladium oudemansii

Bygningsdel: Dobbelt gipskartonpladevæg på stålskelet

Materialer: Gipskartonplade

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	3

**MATERIALE NR.: 23** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Børneinstitution **Opførelsesår:** 1993

**Lokale:** Depotrum i kælder

**Årsag:** Indtrængen af vand (utæt membran) fra terræn

**Skimmelsvampe:** *Prøve A:*  
 Massiv vækst, Penicillium chrysogenum, dominerende, Ulocladium oudemansii, dominerende, Aspergillus sp.  
*Prøve B:*  
 Massiv vækst, Stachybotrys chartarum, dominerende, Penicillium chrysogenum, dominerende, Aspergillus sp., Chaetomium sp., Ulocladium oudemansii

**Bygningsdel:** Dobbelt gipskartonpladevæg på stålskelet

**Materialer:** Gipskartonplade

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

**MATERIALE NR.: 24** **MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole **Opførelsesår:** 1975

**Lokale:** Gang i kælder

**Årsag:** Fugtig kælderydervæg

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Mucor plumbeus, dominerende, Penicillium chrysogenum, dominerende, Gær sp., Rhodotorula sp., Mycothypha sp.

**Bygningsdel:** Betonydervæg (under tærræn) med malet hessian

**Materialer:** Malet hessiantapet

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:** Ca. 1,5 m<sup>2</sup>

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 25

Bygningstype: Skole Opførelsesår: 1975

Lokale: Gang i kælder

Årsag: Skønnes at skyldes utæthed (nu udbedret) i rørinstallation

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Penicillium flavigenum, dominerende, Gær sp.

Bygningsdel: Nedhængt loft af perforerede metalprofiler med folie (minus mineralfibre)

Materialer: Folie fra perforerede metalprofiler (akustikloft)

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst:

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	4

MATERIALESKEMA

MATERIALE NR.: 25 A

Bygningstype: Børneinstitution Opførelsesår: i 60'erne

Lokale: Gang

Årsag: Utæt tag ved ovenlys

Skimmelsvampe: Massiv vækst, Trichoderma sp., dominerende, Gær sp., Penicillium sp.

Bygningsdel: Fladt tag, tagpap, mineraluld, dampspærre, spredt forskalling, mineralfiberplader.

Materialer: Presset mineralfiberloftsplade limet med vandopløselig lim (stivelse)(Karlit)

Opfugtningsperiode: Langvarig, over 6 måneder

Omfang af svampevækst: 0,5 - 1,0 m<sup>2</sup>

Indeks for svampevækst:

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6



**MATERIALE NR.:** 26

**MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole, pavillon **Opførelsesår:** sidst i 50'erne

**Lokale:** Musikundervisningslokale

**Årsag:** Utæt tag (manglende vedligeholdelse)

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Penicillium sp., dominerende, Acremonium sp., Gær sp., Stachybotrys sp.

**Bygningsdel:** Tag: Fladt tag med tagpap, underpap, brædder, hulrum, mineraluld med crepepapir, gipskartonplader

**Materialer:** Crepepapir fra isoleringsmåtte

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

**MATERIALE NR.:** 27

**MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Skole, pavillon **Opførelsesår:** sidst i 50'erne

**Lokale:** Musikundervisningslokale

**Årsag:** Utæt tag (manglende vedligeholdelse)

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst, Gær sp. (mørk), dominerende, Acremonium sp., Aspergillus sp., Gær sp. (hvid), Penicillium sp., Stachybotrys sp.

**Bygningsdel:** Tag: Fladt tag med tagpap, underpap, brædder, hulrum, mineraluld med crepepapir, gipskartonplader

**Materialer:** Træbrædder (underlag for tagpap)

**Opfugtningsperiode:** Langvarig, over 6 måneder

**Omfang af svampevækst:**

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	5

**MATERIALE NR.:** 28

**MATERIALESKEMA**

**Bygningstype:** Plejehjem **Opførelsesår:** 1968

**Lokale:**

**Årsag:** Kondens på udluftningsrør og jerndrager i loftrum, evt. utæt tag.

**Skimmelsvampe:** Massiv vækst. Aspergillus sp. (mørk), dominerende, Acremonium sp., Penicillium sp., Phoma sp., Rhodotorula sp., Trichosporon sp.

**Bygningsdel:** Loftkonstruktion: Mineraluld, aluminiumsfolie, trælægter, gipskartonplader

**Materialer:** Trælægter

**Opfugtningsperiode:**

**Omfang af svampevækst:** 1 - 2 m<sup>2</sup>

**Indeks for svampevækst:**

Overfladestruktur	Ru	X
Vedligeholdelsestilstand	Dårlig	X
Alder	Over 2 år	X
Belastning, slid mm	Stor	X
Tilgængelighed	Vanskelig	X
Renholdningstilstand	Dårlig	X
ΣPotentiale for svampevækst	( 0=lille, 6=stor)	6

## Bilag 5

### Foreløbig rapport fra AMI og DTU med metodebeskrivelser og analyseresultater

Dette bilag beskriver de resultater, der er opnået på henholdsvis AMI og DTU. Arbejdet har været koordineret således, at der har været arbejdet med de samme skimmelsvampeisolater begge steder. Isolatet af *Stachybotrys chartarum* er ligeledes det samme, som det der blev anvendt under udviklingen af gips-agar medier.

### Formål

Formålet har været at undersøge hvilke VOC'er (volatile organic compounds) tre af de vigtigste indeklimasvampe, *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus versicolor* og *Penicillium chrysogenum* er i stand til af producere på henholdsvis byggematerialer, dvs. gipsplader, og på to syntetiske medier baseret på tapetklister og gips-agar. Udviklingen af sidstnævnte medium er udførligt beskrevet indledende i rapporten.

På DTU har det ligeledes været et formål at få udviklet en metode til påvisning af makrocycliske trichothecener og specielt Satratoxin H.

### Metoder (AMI)

En gipsplade, som var angrebet af skimmelsvampe fra en problembygning blev skåret i stykker på 8 x 15 cm. Heraf blev to stykker udtaget og overført til steril 1 l glaskolbe med 150 ml sterilt vand.

Stykker uden synlig vækst eller gamle vandskjolder blev steriliseret med gamma stråler (25KGy). Herefter blev de podet med følgende skimmelsvampeisolater, *S. chartarum* (IBT 14915), *A. versicolor* (IBT 16000) og *P. chrysogenum* (IBT 15996) og ligeledes overført til sterile 1 l glaskolber tilsat 150 ml sterilt vand.

Efter 8 eller 19 dage (afhængig af væksthastigheden) opsamles ca. 1.5 l luft gennem Tenax TA rør og analyseres på samme måde som beskrevet tidligere.

### Resultater og diskussion

Tabel 1 viser VOC'er identificeret fra skimmelsvampevækst på gipsplader podet med de tre isolater og fra vækst af den naturlige flora. Der var klar forskel imellem de tre isolater, dog dannede alle store mængder af 2-methyl-1-propanol. Karakteristisk for *P. chrysogenum* var methylketoner og de analoge sekundære alkoholer. For *S. chartarum* blev der fundet 1-butanol og aromatiske methylethere.

Det ses, at der er meget stor lighed mellem de stoffer, der er fundet på pladen podet med *P. chrysogenum* og den naturligt inficerede plade, der også havde tydelig vækst af en sandsynlig *Penicillium*.

Stoffer	Naturlige *	<i>P.chrys.</i>	<i>A.vers.</i>	<i>S.chart.</i>
1-propanol	++			
2-butanone	++			
2-methyl-1-propanol	+++	+++	+++	+++
1-butanol				++
2-pentanone	+++	+++		
methyl 2-methylpropionate				+
2-hexanone	+++	++		
2-hexanol	+	+		
2-heptanone	+++	+++		
anisole				+++
2-heptanol	+	+++		
3-octanone	+	+		
octenol		+		
2-octanone	+++	+++		
2-octanol	+	++		
o-methylanisole				+
m-methylanisole	+			+
2-nonanone	+	++		
2-nonanol		+++		

Tabel 1. VOC'er fra gipsplader (\* naturlige flora, andre forsøg med podet strålesteriliserede plader, korrigeret for blind, +, ++, +++ = relative koncentrationer af stoffer)

### Metoder (DTU)

Følgende isolater er blevet undersøgt for VOC dannelse: *Stachybotrys chartarum*: IBT 7617, 7711, 14915; *Aspergillus versicolor*: IBT 14938, 15940, 16000 og *Penicillium chrysogenum*: IBT 14921, 15969, 15996. Isolaterne er dyrket på tapetklistermedium (Gravesen, S., Nielsen, P.A og Larsen, T.O.; 1994) og på gips-agar medium. Svampene podes som 4-stik på 15 cm agar plader i glas Petri skåle.

VOC'er er opsamlet ved hjælp af FLEC'en ved adsorption på SKC kulampuller. Ampullen åbnes i begge ender, og monteres således at

udgangsluften fra FLEC'en ledes igennem. Der monteres ligeledes en glasampul i luftindgangen, således at der kun kommer ren luft ind i FLEC'en. Opsamling sker fra 12-72 timer ved flowhastigheder mellem 10-25 ml/min.

De opsamlede VOC'er desorberes ved ekstraktion med ether, dehydreres og inddampes under N<sub>2</sub> inden analysen ved GC-MS, som beskrevet i bilag 1.

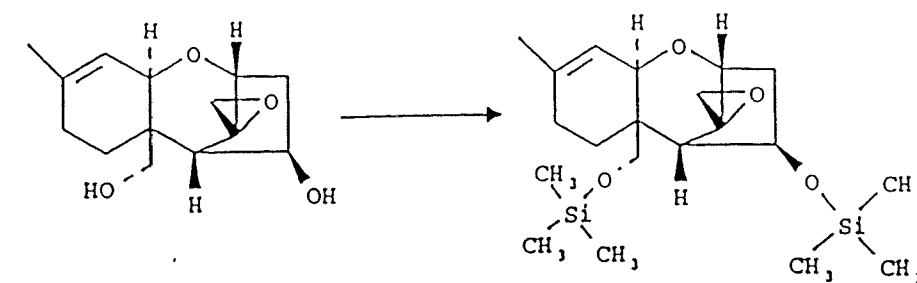
### Macrocykliske trichothecener

Alle tre isolater af *S. chartarum* podes op på 800 g ris tilsat 2400 ml dobbelt destilleret vand og 6 ml spormetal opløsning hvorpå de vokser i 6 uger.

IBT 7711 ekstraheres med 2 l dichlormethan, som filtreres på Büchnertragt. Vand fjernes med natriumsulfat, og opløsningen inddampes under vakuum ved 37°C. Inddampningsresten opløses i 300 ml methanol og affedtes i skilletragt 2 gange med 100 ml petroleumbenzin. Methanolfasen inddampes under vakuum ved 37°C, genopløses i 300 ml dichlormethan, der vaskes med vand, der inddampes som ovenfor.

Ekstraktet fraktioneres på en kiselgel kolonne (15 g) ved flash kromatografi. Som eluenter anvendes i rækkefølge 150 ml hexan, 150 ml diethylether og 150 ml chloroform/methanol (97:3). Der opsamles tre fraktioner, der hver især inddampes til 5 ml.

Detektion af makrocykliske trichothecener foregår ved at påvise disilylverrucarol (Fig. 1). Verrucarol fremkommer ved hydrolyse af f.eks. Satratoxin H. Prøven inddampes i 5 ml prøveglas til tørhed med N<sub>2</sub>-flow og der tilsættes 0.5 ml 0.3 M NaOH i methanol. Prøven stilles 2-3 timer i varmeskab ved 60°C, efterfølgende inddampes den til tørhed med N<sub>2</sub>-flow, og der tilsættes 0.5 ml trimethylsilylimididasol. Prøven stilles 15-30 min i varmeskab ved 60°C. Efter nedkøling tilsættes 3 ml dobbelt destilleret vand, der ekstraheres to gange med 2 ml hexan. De kombinerede diethylether faser opkoncentreres med N<sub>2</sub>-flow og analyseres ved GC-MS. De oparbejdede fraktioner analyseres ligeledes for Satratoxin H vha. HPLC analyse på en HP 1090 Series 2 med en DAD-detektor, og en 100 mm x 4 mm HP Hypersil BDS-C18, 3 µm C18 kolonne, der køres med 1 ml/min med et vand-acetonitril solventsyst. Der startes med 15% acetonitril der øges lineært til 100% på 40 min, hvorefter der køres isokratisk i 3 min. Begge solventer er tilsat 0.5 µl/l trifluoroeddikesyre.



Figur 1. Silylering af verrucarol.

### Resultater og diskussion

Tabellerne 2-3 beskriver de flygtige stoffer, der er fundet på tapetklistermedium, idet der ikke kunne påvises nogen stoffer fra gips-agar. *A. versicolor* dannede tilsyneladende heller ingen stoffer på tapetklistermedium.

Det ses, at der for *S. chartarum* findes de samme stoffer fra alle tre isolater. To af stofferne, med en sandsynlig molvægt på 142, har det ikke været muligt at identificere. 3-oktanon er derimod ofte fundet fra skimmelsvampe. To af *P. chrysogenum* isolaterne dannede ligeledes 3-oktanon samt "svampe alkoholen" 1-okten-3-ol, hvorimod det tredje isolat istedet dannede en lang række af sesquiterpener.

Denne uoverensstemmelse må skyldes, at der er opsamlet på forskellige tidspunkter af skimmelsvampens vækstforløb. Resultatet er meget interessant og peger på, at der i det videre projektarbejde bør fokuseres på tidsafhængig stofdannelse. En anden faktor der bør inddrages i det videre arbejde er genopfugtning af gamle svampekulturer/vækstmedier, for at studere om dette ligeledes vil bevirke et ændret billede af stofdannelsen.

Skimmelsvamp	IBT nr	Dag	Identificeret VOC'er
<i>S. chartarum</i>	7617	21	SA, SB, 3-octanon
<i>S. chartarum</i>	7711	14	SA, SB, 3-oktanon
<i>S. chartarum</i>	14915	15	SA, SB, 3-oktanon
<i>A. versicolor</i>	14938	-	kontamineret, ingen opsamling af VOC'er
<i>A. versicolor</i>	15940	29	AR
<i>A. versicolor</i>	16000	20	Ingen VOC'er fundet
<i>P. chrysogenum</i>	14921	14	PA, PB, PC, PD, PE, PG, PH, PI, PK, PN, PO, PP, gamma-elemene, cuparen
<i>P. chrysogenum</i>	15969	27	1-okten-3-ol, 3-oktanon, PQ
<i>P. chrysogenum</i>	15996		1-okten-3-ol, 3-oktanon, PQ

Tabel 2. VOC'er dannet på tapetklistermedium. (Forkortelser: Se tabel 3).

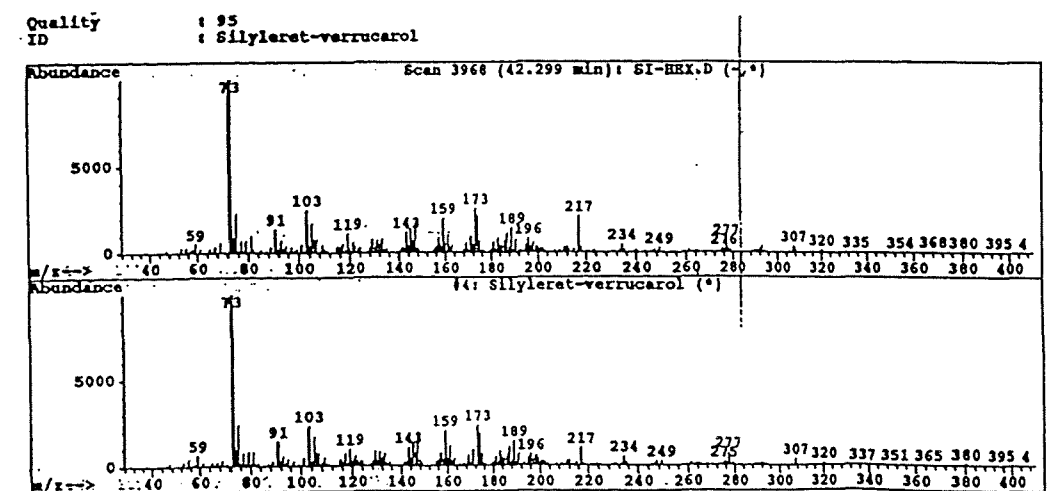
Ved fremtidige dyrkninger på agarmedier indeholdende byggematerialer vil pladespredning med en massiv sporesuspension på agaroverfladen være at foretrække, idet stikpodninger på et substrat som fx gipsagar giver langsom vækst med ringe stofdannelse tilfølgende.

Ud fra de indtil nu indhøstede erfaringer synes FLEC'en at egne sig bedst til undersøgelse af materialer, specielt til feltundersøgelser, hvor der *in situ* skal opsamles VOC'er fra et inficeret byggemateriale et helt konkret sted. Der skal dog foretages yderligere undersøgelser med opsamling fra renkulturer.

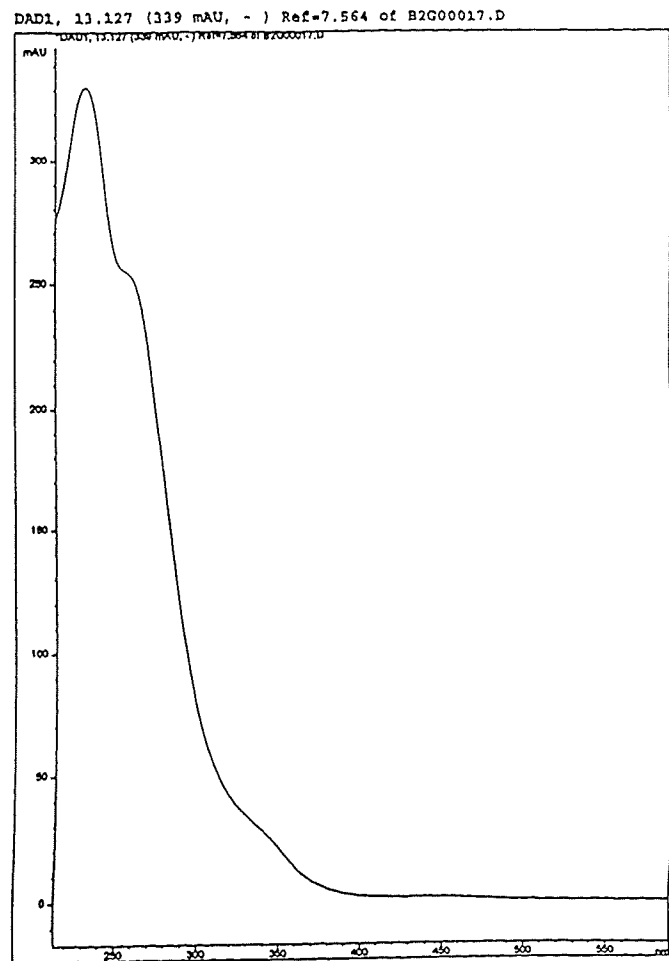
Arbejdet med riskulturene af de *Stachybotrys* isolater ledte til, at det efter omfattende arbejde lykkedes at påvise dannelsen af makrocycliske trichothecener, idet disilylverrucarol blev fundet ved GC-MS analyse (Fig. 2). Dette er således en inddirekte påvisning af at et eller flere af følgende stoffer er blevet dannet af skimmelsvampen: Satratoxin G, H og F, Roridin E, Verrucarol B og J, og triverrucarol A og B. HPLC analyse af et af ekstrakterne indeholdt et stof med et spektrum helt analogt til det der kendes for Satratoxin H (Fig. 3). Da Satratoxin H normalt er det toxin, der produceres i størst mængde, er der således en meget god indikation af, at Satratoxin H er påvist.

Ukendt	Ioner i rækkefølge efter størrelse	RI	Stofgruppe
PA	109, 110, 95, 67	813	
PB	55, 84, 45	791	
PC	107, 91, 150, 79	981	monoterpene (C11?)
PD	107, 93, 79, 94, 135, 150, 121	1013	monoterpene (C11?)
PE	108, 93, 67	1116	monoterpene
PG	161, 121, 93, 105, 204	1380	sesquiterpene
PH	119, 121, 189, 134, 93, 67, 107	1471	sesquiterpene
PI	160, 175, 132, 204		sesquiterpene
PK	93, 121, 189, 134, 93, 67, 107	1504	sesquiterpene
PN	93, 107, 119, 135, 79, 204	1535	sesquiterpene
PO	93, 119, 121, 79, 204	1545	sesquiterpene
PP	91, 155, 199, 90	1554	
PQ	83, 97, 57, 81, 55, 111	1589	
AR	149, 177, 46, 66, 85	1821	urenhed?
SA	100, 71, 72, 142	945	
SB	72, 71, 98, 100, 142	982	

Tabel 3: Strukturelt ukendte VOC'er dannet ved skimmelvækst på tapetklistermedium.



Figur 2. Massespektrum af disilylverrucarol sammenlignet med spektrum af den tilsvarende standard.



Figur 3. Formodet UV-spektrum af Satratoxin H.

### Samlet konklusion

Såvel på AMI som på DTU er det lykkedes at påvise flygtige stoffer produceret af *Stachybotrys chartarum* på henholdsvis gipsplade og tapetlim-agar. Der er således påvist ialt 9 stoffer. På grund af svampens langsomme vækst på gips-agarmediet, som nævnt ovenfor, har det imidlertid ikke været muligt indefor den givne tidsramme at foretage sammenligninger mellem de to laboratoriers fund.

Som nævnt ovenfor indikerer resultaterne for *P. chrysogenum*, at der sker ændringer i produktion af flygtige stoffer med tiden, hvilket måske er et overset fænomen. Det vil således være meget relevant i det videre projektarbejde at studere emissionen af flygtige stoffer med tiden, måske over adskillige uger (1-2 mdr.)

Tilsvarende vil det være interessant at gå mere i dybden med gentagne opfugtninger af det samme inficerede byggemateriale for at få belyst, hvordan skimmelkulturer opfører sig under sådanne betingelser.

Det er for første gang i Danmark lykkedes at påvise makrocycliske trichothecener fra *Stachybotrys* og specielt Satratoxin H. Erfaringerne fra

det omfattende metodeudviklingsarbejde vil blive brugt i det kommende år til at videreudvikle og forenkle den noget komplicerede metode beskrevet i dette bilag. Det er nødvendigt med udvikling af en speciel oprensningsprocedure af stoffet inden selve detektion. Til dette formål ville det være meget formålstjenligt, at flere af trichothecenerne var tilgængelige som standarder.



Meddelelsen er en beskrivelse af de metoder, der er brugt, og de resultater der er opnået i forbindelse med udredningen af de problemer, der er forbundet med vækst af mikroorganismer i vandskadede bygninger. Hensigten med at udsende meddelelsen som en midtvejsrapport med de resultater, der foreligger på nuværende tidspunkt, er så hurtigt som muligt at kunne videregive de indhøstede erfaringer til byggebranchen.