

Bakterieforekomst i opfugtede konstruktioner

Projekt støttet af Grundejernes Investeringsfond og Realdania

December 2019



**TEKNOLOGISK
INSTITUT**



**TEKNOLOGISK
INSTITUT**

Bakterieforekomst i opfugtede konstruktioner

Projekt støttet af Grundejernes Investeringsfond og Realdania

Udarbejdet af:
Teknologisk Institut
Gregersensvej
2630 Taastrup

December 2019



Indhold

1.	Formål	4
2.	Generelt om bakterier i bygninger	4
3.	Prøvetagning.....	5
3.1.	Metoder	5
3.2.	Fordele og ulemper ved de forskellige prøvetagningsmetoder	6
4.	Resultater af prøvetagning	7
4.1.	Vækst af bakterier vs. skimmelsvampe.....	7
4.2.	Bakterieniveau.....	7
4.3.	Bactiquant®-surface vs. TSA-agarplader	8
4.4.	Endotoxintest	8
4.5.	DNA-analyse.....	9
4.6.	Evaluering og konklusioner ud fra prøvetagning og resultater.....	9
4.7.	Highlights af konklusioner ud fra prøvetagning og resultater.....	10
5.	Afrensning og udbedring.....	10
5.1.	Laboratorieforsøg.....	10
5.2.	Evaluering og konklusioner ud fra laboratorieforsøg.....	12
5.3.	Highlights af konklusioner ud fra laboratorieforsøg.....	12
6.	Afsluttende kommentarer	12



1. Formål

Formålet med dette projekt er at belyse bakterieforekomst samt artssammensætning af bakterier i opfugtede konstruktioner i boliger i Danmark.

Derudover ønskes det belyst, om der ved fund af skimmelsvampevækst i opfugtede konstruktioner ligeledes kan påvises vækst af bakterier.

Det ønskede output af projektet er at udarbejde en vejledning til en valid prøvetagningsmetode for bakterieforekomst ud fra erfaringer opnået i projektet samt udarbejde vejledning til nødvendig og korrekt afrensning, hvis skaden er sket.

Denne rapport er til intern orientering til opdragsgivere.

2. Generelt om bakterier i bygninger

Der er bakterier i en hvilken som helst bolig, men normalt er det i niveauer, der næppe er sundheds-skadelige. Disse bakterier stammer fra bl.a. hud, hår og støv. De gør os sjældent syge, da vores immunforsvar nemt kan bekæmpe dem. Almindelig rengøring vil holde antallet af disse typer af bakterier nede og bør ikke vække uro.

Men sker der en vandskade, vil niveauet af bakterier forhøjes og andre arter af bakterier kan forekomme, der kan give sundhedsudfordringer. Her er det vigtigt at skelne mellem vandskader iblandet kloakvand med fækale bakterier eller vandskader med kun regnvand, hvor fækale bakterier næppe optræder.

Mistanke om indeklimaproblemer fører ofte til en undersøgelse af fugt og skimmelforekomst. Det er almindeligt kendt, at skimmelsvampevækst i boliger i visse tilfælde kan medføre helbreds-mæssige gener. Men meget høj fugt, måske endda blankt vand, giver bedre vækstvilkår for bakterier end for skimmelsvampe. Det betyder, at man i forbindelse med egentlige vandskader, fx oversvømmelse eller rørskader, bør undersøge for både skimmelsvampe og bakterier.

Dårlig mikrobiologisk lugt i boligen kan være et tegn på både vækst af skimmelsvampe og bakterier eller begge dele. Bakterier kan have en meget kraftig lugt, der kan give gener i indeklimaet. Disse lugte kan minde om dem, man kender fra skimmelsvampe, og kan dermed forveksles. I bygnings-mæssig sammenhæng kan en kælderlugt eller lugt af jordslåethed, som ikke kan forklares ved vækst af skimmelsvampe, stamme fra vækst af bakterier.

Et godt indeklima i bygninger reducerer symptomer som hovedpine, træthed og koncentrationsbe-svær hos beboere. Da vi opholder os 80-90% af tiden inden døre er det af stor relevans at fokusere på, at det indeklima, vi opholder os i, skal være så godt som muligt.



Med fremtidens varslede hyppigere ekstreme vejrhændelser præget af store nedbørsmængder, er der forøget risiko for, at bebyggelser oftere udsættes for indtrængende vand, som medfører opfugtede konstruktioner. Derfor er det af stor betydning at få undersøgt, hvad der sker med bakterieniveauet samt evt. artssammensætningen af bakterier, når uheldet har været ude og konstruktioner er blevet opfugtede.

3. Prøvetagning

I projektet "Bakterieforekomst i opfugtede konstruktioner" er der udtaget prøver fra 65 ejendomme. Prøverne er udtaget af erfarne bygningskonsulenter fra Teknologisk Institut i forbindelse med fugt og mikrobiologisk undersøgelse af boligen, hvor der er målt høj fugtighed på prøvestedet. Ligeledes har beboere haft gener i form af f.eks. hovedpine, irritation af slimhinder og luftveje samt vejrtrækningsbesvær og medfølgende træthed.

Prøverne er udtaget på hovedsageligt 3 materialer: beton, træ og puds.

Derudover er der udtaget referenceprøver i 25 ejendomme, hvor materialerne ikke var opfugtede.

Prøverne er efter udtagning analyseret på Mikrobiologisk Laboratorium, Teknologisk Institut.

3.1. Metoder

Der findes flere forskellige metoder for prøvetagning til at påvise bakterier i en bygning.

Vi har i dette projekt anvendt nedenstående metoder:

- TSA-agarplade; anvendes ved aftryk på en overflade og er gode til at identificere om der er et problem her og nu. TSA (Tryptic Soy Agar) er et universal medie, der anvendes til dyrkning af bakterier, idet de fleste bakterier kan gro på dette medie.
Agarpladerne dyrkes ved 37°C i 2 døgn, hvorefter fremkomne bakteriekolonier tælles og angives som CFU (Colony Forming Units).
- Bactiquant®-surface er en analyse, hvor der med en særlig vatpind, tørres godt over et areal på 9 cm². Herved opsamles de eventuelle bakterier, der vil være på overfladen.
Metoden kvantificerer bakterier ved at bestemme en hydrolase aktivitet; dvs. tilstedeværelsen af et enzym, som dannes i bakterier. Enzymaktiviteten bestemmes med en meget sensitiv fluorometrisk teknologi.
Resultaterne inddeles i tre kategorier: A=ren, B=snævset og C=kontamineret.
- Svabertest er en analyse, hvor en vatpind tørres over et kendt areal et areal på 9 cm².
Vatpinden dyppes i 1 ml 0,9%NaCl, hvorved bakterierne frigives til væsken, som kan overføres til dyrkningsmedier. Dette muliggør dyrkning på flere forskellige slags næringsmedier, der er selektive for bestemte bakterier. Derudover kan opløsningen anvendes til at foretage en endotoxintest samt DNA oprensning til qPCR.



3.2. Fordele og ulemper ved de forskellige prøvetagningsmetoder

TSA-agarplader, med aftryk direkte på en overflade, kan efter dyrkning blive overgroet af bakterier, så det kan være vanskeligt at tælle fremdyrkede bakteriekolonier og dermed umuligt at angive det præcise antal bakterier. En anden ulempe er, at pladerne bliver domineret af de bakterier, der vokser hurtigst. Det vil sige, at nogle bakterier ikke fremdyrkes, og dermed får man ikke det reelle billede af bakterieforekomsten på den overflade, hvor aftrykspladen er taget. Derudover skal agarpladen dyrkes i 2 døgn, inden den kan analyseres.

Bactiquant®-surface kan give et her og nu billede af bakteriemængden i det pågældende område, hvor prøven tages.

Bactiquant®-surface har den fordel, at analysesvaret foreligger hurtigt, da prøven kan køres med det samme ved modtagelse i laboratoriet og svar foreligger ca. ½ time efter. Ydermere er det en relativ simpel metode at anvende.

Ulempen er, at det udelukkende er en kvantificering af bakterier på en overflade, og resultatet giver således ikke noget svar på, hvilke bakterier der findes på overfladen.

Svabertest har den fordel, at den kan anvendes til mange forskellige analyser. Efter opløsning i 0,9% NaCl kan man udplade opløsningen på flere medier, der er selektive for forskellige bakterier. Inden udpladning kan opløsningen ligeledes fortyndes, hvilket giver den fordel, at man kan få antallet af bakteriekolonier på pladerne ned i et niveau, der efter dyrkning kan tælles på pladen. Direkte aftryk på en overflade med TSA-agarplader efter dyrkning kan være svære at aflæse grundet mange bakteriekolonier samt det faktum, at nogle bakteriekolonier spreder sig over hele pladen og dermed måske forhindrer vækst af andre bakterier. Udplader man derimod en fortynding, er mulighederne for aflæsning af det totale antal kolonier samt arter væsentlig bedre.

Ulempen er, at medierne skal dyrkes i 2-5 døgn, inden de kan analyseres.

Opløsningen kan ligeledes anvendes til måling af endotoxiner. Endotoxiner er en toksisk del i cellevæggen hos de Gram-negative bakterier, der sidder i forbindelse med den ydre cellemembran. Når overfladen er udtørret og de gram negative bakterier dør, udskilles endotoxinet. I dette projekt har vi anvendt den meget følsomme LAL (Limulus amebocyte Lysate) test til måling af endotoxiner.

Ulempen er, at testen er dyr og relativt svær at anvende. Derudover findes ingen officielle grænseværdier for endotoxiner, hvilket gør det vanskeligt at vurdere, hvad der er "normal-niveauer" vs. for høje niveauer.

Fra opløsningen kan der også oprenses DNA, så der kan udføres en qPCR analyse. I projektet har vi anvendt primere/prober for grampositive og gramnegative bakterier, så der skelnes mellem disse to grupper af bakterier.

Fordelen ved DNA-oprensning og efterfølgende qPCR analyse er, at denne metode kan påvise flere typer af bakterier ved selektion af disse (primere/prober til specifikke bakterier), og dermed ikke kun de hurtigst voksende, der vil have overtaget på de klassiske dyrkningsmetoder som agarplader.



4. Resultater af prøvetagning

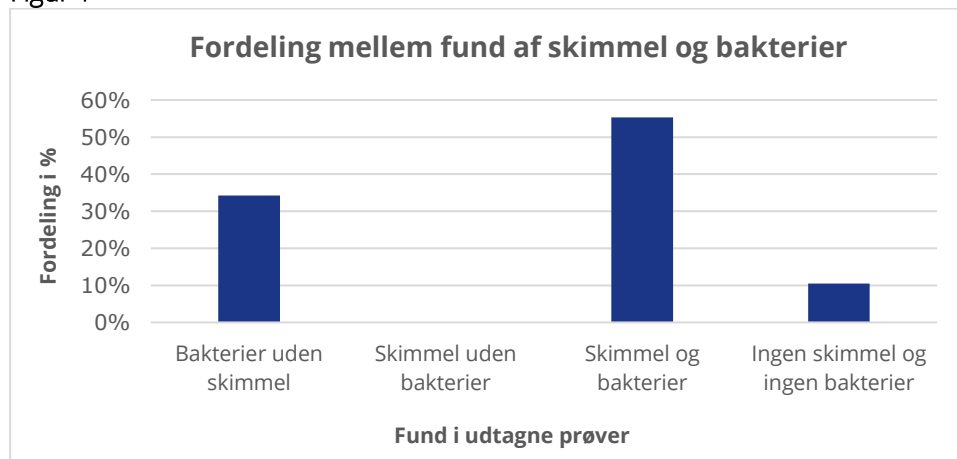
Projektet har givet følgende interessante resultater vedr. sammenhængen mellem bakterieforekomst og skimmelsvampeforekomst, sammenhængen mellem fugt og bakterieforekomst og de forskellige prøvetagningsmetoder.

Resultaterne præsenteres i de følgende afsnit.

4.1. Vækst af bakterier vs. skimmelsvampe

Ved bygningsundersøgelserne blev der taget prøver for både bakterie- samt skimmelsvampevækst i form af aftrykplader. Resultaterne af disse har vist, at bakterier også er til stede, når der er vækst af skimmelsvampe i opfugtede konstruktioner. Men projektet har også vist, at bakterier kan være til stede, uden der er påvist vækst af skimmelsvampe. Vi har ikke fundet skimmelsvampevækst alene, men altid i kombination med bakterievækst på de valgte prøvesteder. Netop disse resultater er yderst interessante især set i det perspektiv, at vækst af skimmelsvampe har været i fokus ved indeklimamæssige gener hos beboere, hvorimod bakterier ikke har haft samme fokus.

Figur 1



Figur 1: Bakterier trives i opfugtede konstruktioner uden tilstedeværelse af skimmel. På de valgte prøvesteder ses ikke skimmelvækst uden der også er bakterier til stede.

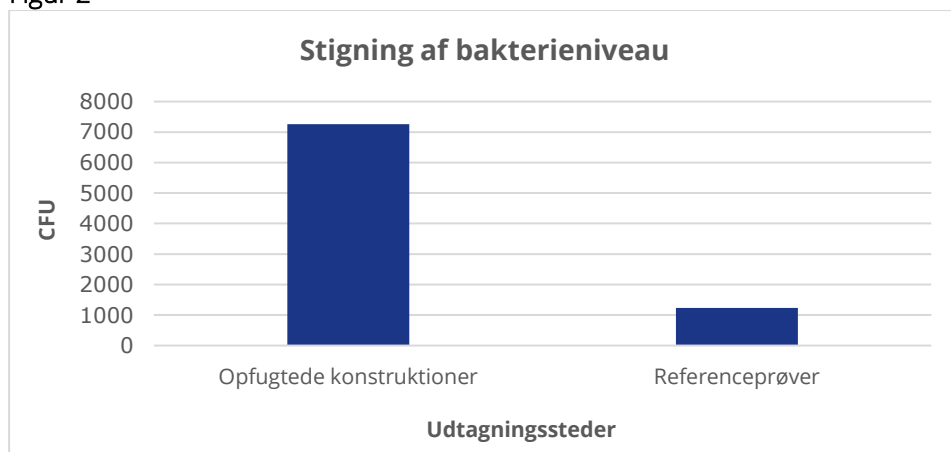
4.2. Bakterieniveau

Projektet har vist, at der sker en væsentlig stigning i antal af bakterier ved prøver taget på opfugtede konstruktioner vs. prøver taget på ikke opfugtede konstruktioner (referenceprøver).

Artssammensætning af bakterier på TSA-agarplader har været overvejende grampositive bakterier. Ved dyrkning i laboratoriet har pladerne generelt udskilt en kraftig og dårlig lugt.



Figur 2



Figur 2: Der ses en væsentlig stigning af antallet af bakterier i opfugtede konstruktioner i forhold til fund i konstruktioner med normalt fugtniveau. CFU: Colony Forming Unit (antallet af bakteriekolonier).

4.3. Bactiquant®-surface vs. TSA-agarplader

Ved sammenligning af Bactiquant®-surface metoden med TSA-agarplader har vi i ~75% af bygningsundersøgelserne fundet positivt sammenfald mellem det fremdyrkede antal af bakteriekolonier på TSA-agarpladerne og Bactiquant®-surface resultater. Dette indikerer, at de to prøvningsmetoder i overvejende grad giver sammenlignelige resultater.

I de resterende ~25% af undersøgelserne er der dog ikke sammenfald, og der er fundet både høje Bactiquant®-surface resultater vs. lavt antal bakteriekolonier på TSA-agarplader samt vise versa.

4.4. Endotoxintest

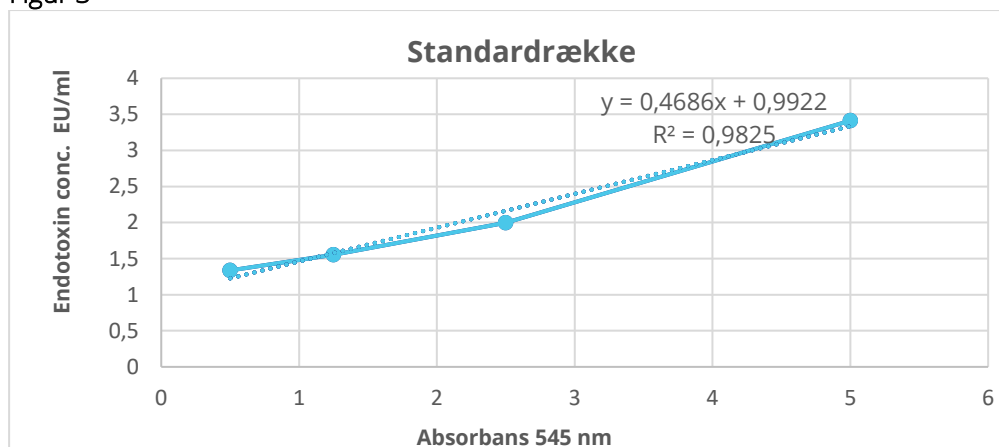
Endotoxintest har påvist, at der er gram negative bakterier til stede i opfugtede konstruktioner. Som tidligere nævnt findes ingen officielle grænseværdier for endotoxiner, hvilket besværliggør en vurdering af resultaterne i forhold til, hvad der er "normal-niveauer" vs. forhøjede niveauer.

Endotoxin beregnes ud fra en standardkurve og angives som EU/ml (Endotoxin Unit).

Målingen af prøverne (absorbans) omregnes og angives som EU/m²



Figur 3



Figur 3: Eksempel på standardkurve ud fra standarddrække; hvorfra koncentrationen af endotoxiner i prøverne beregnes.

Vi har i dette projekt fundet et gennemsnit på 2606 EU/m² i de testede prøver (N=20). (Max 2922 EU/m²; Min 1640 EU/m²)

Resultatet viser, at vi finder gramnegative bakterier ved denne test, som vi ikke får dyrket frem på TSA-agarplader, hvor hovedparten af de fremvoksede bakterier er grampositive bakterier. Det toksiske endotoxin er indkapslet inde i bakterierne og udskilles først, når bakterierne dør. Ved udtørring dør bakterierne og de gram negative bakterier udskiller endotoxinet, hvorfor afrensning kan være nødvendig.

4.5. DNA-analyse

Efter oprensning af DNA blev der udført qPCR analyse på en Roche LightCycler®96. De anvendte primere og probere selekterede henholdsvis grampositive og gramnegative bakterier. Resultatet af denne analyse indikerer, som ved endotoxintest, tilstedeværelse af gramnegative bakterier, som ikke dyrkes frem på TSA-agarplader, hvor de grampositive bakterier klart dominerer.

4.6. Evaluering og konklusioner ud fra prøvetagning og resultater

Prøvetagningen i boligerne er udført på fugtige konstruktioner med referenceprøver på tørre konstruktioner og primært på materialerne beton, puds og træ. Resultaterne viser, at der i ~35% af prøverne udtaget på agarplader er fundet bakterievækst, uden der er konstateret vækst af skimmelsvampe. Dette indikerer, at bakterietest bør være en del af den prøvepakke, som en bygningskonsulent medbringer ved en bygningsundersøgelse, og udtages i kombination med skimmelprøver, hvor fugtigheden på materialeoverfladen er meget høj.

De forskellige prøvetagningsmetoder har vist, at der kan være divergerende resultater i forhold til, hvilken prøvetagningsmetode, der anvendes. En prøvetagningsmetode bør derfor ikke stå alene, men flere metoder bør anvendes, således resultaterne kan supplere hinanden, og derved give et mere sikkert grundlag for vurdering af bakterieforekomsten og efterfølgende skadesudbedring.



Mikrobiologisk undersøgelse af en bolig for såvel skimmelsvampe som bakterier skal altid udføres i kombination med en fugtteknisk undersøgelse og skadesudredning. Det kræver et indgående kendskab til bygninger, konstruktioner, fugtforhold og mikrobiologi for at kunne vurdere skadens art, omfang og årsag samt beskrive nødvendige tiltag til udbedring og afrensning samt eventuel forebyggelse af skader.

4.7. Highlights af konklusioner ud fra prøvetagning og resultater

- Lugtgener i boligen kan stamme alene fra bakterievækst
- Bakterietest bør altid udtages i kombination med en grundig bygningsundersøgelse, hvor fugtmålinger viser høj fugtighed på materialeoverflader, og hvor der også tages prøver til skimmelanalyse
- Én testmetode bør ikke stå alene
- Vælg forskellige testmetoder der kan supplere hinanden
- Prøvetagning er et supplement til en bygningsundersøgelse

5. Afrensning og udbedring

Det er af stor betydning, at der umiddelbart efter fund af en fugt-/vandskade sker en udtørring af de opfugtede konstruktioner. Det er vigtigt at få fundet og elimineret fugtkilde(n)rne effektivt og få udtørret til et niveau, hvor der ikke dannes grundlag for vækst af skimmelsvampe og bakterier.

Da både vækst af skimmelsvampe samt bakterier mistænkes at kunne give helbreds-mæssige gener er en efterfølgende afrensning af materialeoverflader, der har været fugtskadede eller i umiddelbar forbindelse med fugt, rigtig vigtig. Her skal man vælge et passende desinfektionsmiddel, der er egnet til skimmelsvampe og bakterier.

I forbindelse med projektet blev et laboratorieforsøg udført med det formål at belyse effekten af afrensning.

5.1. Laboratorieforsøg

På emner af spånplader samt gipsplader blev 1 ml af en bakteriesuspension separat påført på emner i et område på 10x10 cm. Efter endt kontaktid på 5 min., 24 timer og 48 timer blev der tjekket for vækst inden afrensning ved direkte aftryk med TSA-agarplade.

Herefter blev pladerne afrenset og vækst tjekket umiddelbart efter afrensningen samt efter 15 min. kontaktid ved direkte aftryk med TSA-agarplade (3 repliaker).

Agarplader blev inkuberet ved 37°C i 2-5 døgn og herefter aflæst.

Vi ved, at en essentiel kilde til bakteriers overlevelse er fugt. Vi tilførte ikke fugt til emner påført bakterierne, da vi ønskede at belyse, om bakterierne ville overleve efter hhv. 24 timer og 48 timer på emnerne.



Til afrensningen blev der udvalgt to produkter med henholdsvis klorholdigt indhold og to produkter med kvarternære ammoniumforbindelser. Produkterne blev anvendt i de anbefalede koncentrationer foreskrevet på brugsanvisningen af produktet, og afrensningen foretaget som foreskrevet.

De anvendte bakterier var:

Thermoactinomyces vulgaris, grampositiv bakterie

Streptomyces griseus, grampositiv bakterie

Nocardiopsis dassonvillei, grampositiv bakterie

Pseudomonas aeruginosa, gramnegativ bakterie

Resultater er vist i nedenstående figurer.

Figur 5

	Prøve inden afrensning	Træ		Gips	
		Prøve umiddelbart efter afrensning	Prøve 15 min. efter afrensning	Prøve umiddelbart efter afrensning	Prøve 15 min. efter afrensning
Kontakttd bakterier 5 min.	>>200	-	~50 / 1	-	>200 / 2
Kontakttd bakterier 24 timer	>200	~50 / 1	1 / 0	38 / 0	12 / 3
Kontakttd bakterier 48 timer	0	-	-	-	-

Figur 5: To klorholdige produkter

Tal er angivet i CFU: Colony Forming Unit (antal af bakteriekolonier) – Produkt 1 / Produkt 2

Angivet som det maksimale antal CFU fremdyrket på agarplader for de 4 bakterier.

Figur 6

	Prøve inden afrensning	Træ		Gips	
		Prøve umiddelbart efter afrensning	Prøve 15 min. efter afrensning	Prøve umiddelbart efter afrensning	Prøve 15 min. efter afrensning
Kontakttd bakterier 5 min.	>>200	-	23 / >200	-	>200 / >200
Kontakttd bakterier 24 timer	>200	0 / 66	2 / 1	0 / 16	0 / 3
Kontakttd bakterier 48 timer	0	-	-	-	-

Figur 6: To produkter med kvarternære ammoniumforbindelser

Tal er angivet i CFU: Colony Forming Unit (antal af bakteriekolonier) – Produkt 1 / Produkt 2

Angivet som det maksimale antal CFU fremdyrket på agarplader for de 4 bakterier



5.2. Evaluering og konklusioner ud fra laboratorieforsøg

Overordnet sker der en væsentlig reduktion af antallet af bakterier efter afrensning.

Virketiden af produkterne har indflydelse på, hvor mange bakterier der overlever. Der ses en tendens til, at efter virketid på 15 min. af produkterne falder antallet af CFU. Det er derfor vigtigt, at den korrekte virketid for produktet følges iht. brugsanvisningen, så produktet får lov at virke inden der aftøres.

24 timer efter påføring af bakterier på begge materialer er antallet faldet væsentligt (Prøve inden afrensning). 48 timer efter påføring kan der ikke genfindes kolonier på de dyrkede agarplader (Prøver inden afrensning). De anvendte bakteriestammer overlever altså ikke efter 48 timers påføring uden tilførsel af fugt. Dette gælder for begge materialer; træ og gips.

5.3. Highlights af konklusioner ud fra laboratorieforsøg

- Udtørring af de opfugtede konstruktioner
- Det er vigtigt at følge brugsanvisningen på produktet:
 - Blandingsforholdet skal være korrekt
 - Virketid følges nøje, da virkningen ellers kan blive forringet
 - Personlige værnemidler der skal anvendes ved brug af desinfektionsmidler; handsker, maske etc.
- Man skal sikre sig, at hele det inficerede område bliver desinficeret
- Hvis der er sket opfugtning under gulvbelægninger eller bag vægbeklædninger er det nødvendigt at fjerne disse og afrense den faste konstruktion dvs. fx betondæk eller murværk
- Drik, spis og ryg ikke imens der afrenses og rør ikke øjne og næse

Efter afrensning af vandskadede områder kan en analyse til at kontrollere effekten af afrensningen være en fordel, da dette vil give vished for, at afrensningen har været tilstrækkelig. Samtidig er det vigtigt at måle fugtniveauet i konstruktionen, så der skabes sikkerhed for, at udtørringen har været tilstrækkelig inden ibrugtagning.

6. Afsluttende kommentarer

Formålet med dette projekt var at belyse bakterieforekomst samt artssammensætning af bakterier i opfugtede konstruktioner i boliger i Danmark.

Derudover ønskedes det belyst, om der ved fund af skimmelsvampevækst i opfugtede konstruktioner ligeledes kunne påvises vækst af bakterier.

Vi har vist, at bakterier og skimmelsvampe ikke altid går hånd i hånd i opfugtede konstruktioner. Vi har set, at bakterier kan være til stede uden vækst af skimmelsvampe, hvorimod vi ikke har fundet skimmelsvampevækst alene, men altid i kombination med bakterievækst.



Derudover er det vist, at flere prøvetagningsmetoder til analyse for bakterievækst kan være en fordel, da forskellige prøvetagningsmetoder kan give forskellige resultater. Anvendes kun én metode kan det være svært at konkludere alene ud fra denne, hvorimod flere prøvetagningsmetoder vil kunne supplere hinanden. Prøvetagningen skal dog altid ses som et supplement til en bygningsundersøgelse og må aldrig stå alene.

Der findes ikke tilstrækkeligt materiale, der præcist underbygger, hvilke stoffer de forskellige bakterier afgiver, der forårsager lugtgener. De mulige sundhedsmæssige gener relateret til indeklimaet, som beboere kan have, er kun ringe belyst i forhold til bakterievækst, og kræver yderligere undersøgelser for at evaluere deres indvirkning på mennesker.