

Krista Uusi-Kinnala

**MUOVIA HAJOTTAVIEN MIKROBIEN  
KASVUOLOSUHTEET JA MIKRO-  
MUOVIN HAJOTUS JÄTEVEDENPUH-  
DISTAMOLLA**

Kandidaatintyö  
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta  
Johanna Rinta-Kanto  
Marja Palmroth  
Tammikuu 2020

# TIIVISTELMÄ

Krista Uusi-Kinnala: Muovia hajottavien mikrobien kasvuolosuhteet ja mikromuovin hajotus jätevedenpuhdistamolla, Growth conditions of plastic degrading microbes and the degradation of microplastics in wastewater treatment plant

Kandidaatintyö

Tampereen yliopisto

Bio- ja ympäristötekniikka

Tammikuu 2020

---

Jätevedenpuhdistamon kautta ympäristöön kulkeutuu mikromuovia lietteessä ja purkuvedessä. Muovi on peräisin kosmetiikasta, tekstiileistä ja hulevesistä. Ympäristöön päätyvät muovipartikkelit ovat halkaisijaltaan 5 mm -1 µm mikromuovia tai pienempiä partikkeleita eli nanomuovia. Tässä työssä tarkastellaan tunnettujen muovia hajottavien mikrobien ominaisuuksia ja kasvuolosuhteita sekä verrataan niitä jätevedenpuhdistamon biologisten prosessien olosuhteisiin. Vertailun tavoitteena on selvittää, onko mikromuovia mahdollista hajottaa mikrobien avulla jätevedenpuhdistuksen yhteydessä.

Muovi voi hajota biologisesti tai abioottisesti. Biohajoamisessa muovi hajoaa mikrobein erittämien entsyymien vaikutuksesta. Abioottisessa hajoamisessa muovi hajoaa elottoman ympäristön vaikutuksesta kuten, UV-valon tai lämmön johdosta. UV-hajoaminen perustuu polymeeriin absorboituneen UV-valon energialla muodostuneisiin vapaisiin radikaaleihin, joiden reaktioiden seurauksena polymeeri katkeaa tai muodostaa uusia yhdisteitä. Polyeteenin biohajotuksessa mikrobit muodostavat polyeteenin pinnalle biofilmin. Usein biohajotus tapahtuu abioottisen hajotuksen jälkeen, koska mikrobien on vaikea hajottaa suuria polymeerejä. Mikrobit erittävät solun ulkopuolelle entsyymejä, jotka hajottavat polymeerit monomeereikseen tai lyhyemmiksi polymeeriketjuiksi. Mikrobit kykenevät hyödyntämään hajotustuotteita ravintonaan. Biohajottavat mikrobit toimivat yhdessä muodostaen konsortioita, jotka hajottavat muovia nopeammin kuin puhdasviljelmät.

Kaikki mikrobit eivät siedä muovin läsnäoloa, jolloin mikromuovit voivat muuttaa biologisten prosessien mikrobipopulaatiota. Jätevedenpuhdistusprosessissa erityisesti nanomuoveilla on negatiivinen vaikutus biologisiin prosesseihin. Muovipartikkelit ovat niin pieniä, että ne voivat päästä häiritsemään mikrobien soluseinärakenteissa toimivia entsyymejä ja näin vaikuttaa muun muassa typen poistoon.

Polyeteeniä hajottavia mikrobeja esiintyy laajasti maaperässä ja myös jätevesissä. Muovia hajottavilla mikrobeilla on yleensä monipuolinen metabolia ja erityispiirteitä, jotka helpottavat hajottamaan erittäin suuria ja stabiileja muoveja. Esimerkiksi *Rhodococcus ruber*-bakteerilla on soluseinässään pitkät rasvahappomolekyylit, joiden ansiosta se on hydrofobinen ja pystyy muodostamaan biofilmin hydrofobisen polyeteenin pintaan.

Jätevedessä esiintyvistä mikrobeista osa kykenee hajottamaan muovia, mutta nykyinen jätevedenpuhdistusprosessi ei suosi muovin biohajotusta, koska mikrobeilla on helpommin hyödynnettävää orgaanista hiiltä ravintona. Polyeteenin hajottamien solun ulkopuolisilla entsyymeillä vaatii mikrobeilta aikaa ja resursseja syntetisoida sopivat entsyymit, jolloin polyeteeniä hyödynnetään, kun mitään muuta ravintoa ei ole tarjolla. Teoriassa muovin hajottaminen mikrobeilla jätevedenpuhdistamon olosuhteissa on mahdollista, jos muovit saataisiin erilleen muusta orgaanisesta aineksestä. Teorian toteutumiseksi tarvitaan lisätutkimuksia muovia hajottavista mikrobeista ja mahdollisista prosessi-innovaatioista.

Avainsanat: Mikromuovi, biohajotus, muovia hajottavat mikrobit, polyeteeni, jätevesi

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. MUOVIEN HAJOAMINEN JA MERKITYS JÄTEVEDENPUHDISTUKSEEN .....	3
2.1 Muovin abioottinen ja biologinen hajoaminen .....	5
2.2 Biohajoamisen analyysimenetelmiä .....	8
2.3 Muovit jätevedenpuhdistuksessa .....	9
3. POLYETEENIÄ HAJOTTAVIEN JA JÄTEVEDENPUHDISTUKSEN AEROBISTEN MIKROBIEN KASVUOLOSUHTEET .....	13
3.1 Polyeteeniä hajottavien mikrobin ominaisuuksia ja kasvuolosuhteita	13
3.2 Jätevedenpuhdistuksen biologisten prosessien olosuhteita .....	17
4. MUOVIA HAJOTTAVIEN MIKROBIEN SOVELTUMINEN JÄTEVEDENPUHDISTUKSEEN .....	19
5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	21
LÄHTEET .....	23

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

d	päivä
EPS	solun ulkoinen polymeerirakenne (extracellular polymer substance)
HDPE	korkeatiheyksinen polyeteeni (high-density polyethylene)
LDPE	matalatiheyksinen polyeteeni (low-density polyethylene)
LLDPE	lineaarinen matalatiheyksinen polyeteeni (linear low-density polyethylene)
LPS	lipopolysakkaridi (lipopolysaccharide)
LTA	lipoteikkohappo (lipoteichoic acid)
MnP	mangaani peroksidaasi
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	ammoniumioni
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitraatti
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitriitti
PE	polyeteeni
PEG	polyetyleeniglykoli
PES	polyetyleenisukkinaatti
PET	polyteenitereftalaatti, polyesteri
PHB	polyhydroksibutyraatti
PLA	polylaktidi
PP	polypropeeni
PS	polysytreeni
PU	polyuretaani
PVA	polyvinyylialkoholi
PVC	polyvinyylikloridi
SEM	pyyhkäisyelektronimikroskopia

# 1. JOHDANTO

Maailmanlaajuisesti muovia on tuotettu vuosina 1950-2015 noin 8300 miljoonaa tonnia, josta 79 % on päätynyt kaatopaikoille ja ympäristöön (Geyer *et al.* 2017) . Jo pelkästään tämä luku antaa syyn, miksi muovien aiheuttamat ympäristövaikutukset puhuttavat ihmisiä ympäri maailmaa. Muovien hajoaminen kestää satoja vuosia ja siksi on erittäin tärkeää tutkia mahdollisuuksia, joilla muovien pääsy ympäristöön voitaisiin ehkäistä, sekä miten muovi saataisiin pois ympäristöstä (Hopewell *et al.* 2009).

Muovia päätyy jäteveteen ja jätevedenpuhdistamoiden kautta lietteessä maaperään sekä puhdistetun veden mukana vesistöihin. Jätevedenpuhdistuksesta mahdollisesti purkuvesiin pääsevä muovi on mikromuovia ja nanomuovia. (Talvitie *et al.* 2017) Mikromuoviksi määritellään muovikappaleet, joiden halkaisija on 5 mm ja 1 µm välillä. Pienemät partikkelit määritellään nanomuoveiksi. (Enfrin *et al.* 2019) Suuremmat muovin kappaleet jäävät todennäköisesti välppään ja poistuvat jätteen mukana prosessista tai niistä voi irrota pienempiä kappaleita, joita kutsutaan sekundaariseksi mikromuoviksi (Talvitie *et al.* 2017).

Nykyiset jätevedenpuhdistamot on suunniteltu poistamaan kiintoainetta, orgaanista-ainetta ja ravinteita, mutta ei mikromuovia. Jätevedenpuhdistamon läpi kulkee kuitenkin suuri määrä vettä päivittäin, jolloin mikromuovin määrästä tulee merkittävä. Esimerkiksi Viikinmäen jätevedenpuhdistamon läpi kulkee päivittäin noin 270 000 m<sup>3</sup> vettä, joka sisältää noin 380-680 mikroluokan partikkeliä litrassa (Talvitie *et al.* 2017).

Muovin hajoamista luonnossa ja mikrobien kykyä hajottaa eri muovilaatuja on tutkittu pitkään (Otake *et al.* 1995; Albertsson 1980). Vasta vuonna 2016 löydettiin bakteeri nimeltä *Idonella sakaiensis*, joka käyttää pääasiallisena hiilen ja energian lähteenään polyeteenitereftalaattia (PET) (Yoshida *et al.* 2016).

Tässä työssä tarkastellaan tunnettujen muovia hajottavien mikrobien ominaisuuksia ja kasvuolosuhteita ja verrataan niitä jätevedenpuhdistamon biologisten prosessien olosuhteisiin. Vertailun tavoitteena on selvittää, onko mikromuovia mahdollista hajottaa mikrobien avulla jätevedenpuhdistuksen yhteydessä. Työssä käsitellään vain polyeteeniä

(PE) hajottavia aerobisia mikrobeja, koska polyeteeni on yksi yleisimmistä muoveista (PlasticsEurope 2018).

Luvussa 2 käsitellään muovien hajoamisen teoriaa ja mikromuovien merkitystä jätevedenpuhdistuksessa. Luvussa 3 käsitellään muovia hajottavien mikrobien ominaisuuksia ja jätevedenpuhdistamon mikrobien ominaisuuksia sekä kasvuolosuhteita. Luvussa 4 käsitellään muovia hajottavien mikrobien sovelluksia ja pohditaan, miten näitä mikrobeja voitaisiin hyödyntää jätevedenpuhdistuksessa. Työn yhteenveto ja johtopäätökset on esitetty luvussa 5.

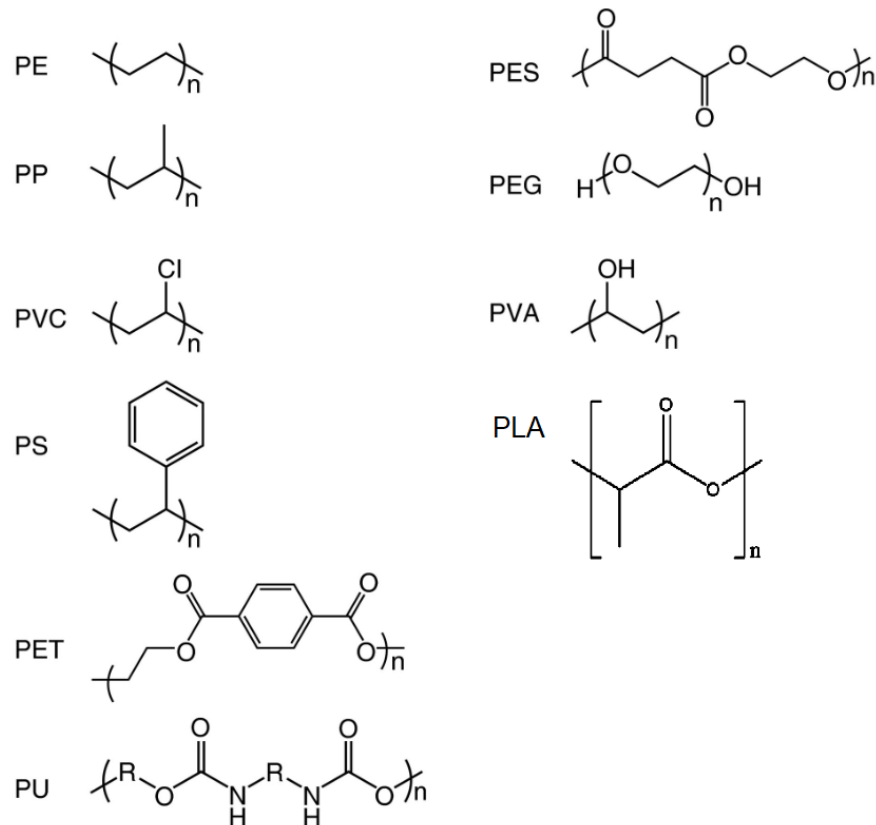
## 2. MUOVIEEN HAJOAMINEN JA MERKITYS JÄTEVEDENPUHDISTUKSEEN

Muovit ovat synteettisesti valmistettuja materiaaleja, jotka koostuvat polymeereistä ja lisäaineista. Muoveja voidaan valmistaa petrokemiallisesti öljystä tai uusiutuvista raaka-aineista kuten tärkkelyksestä. (Zheng *et al.* 2005) Polymeerit koostuvat toistuvista monomeereistä, jotka muodostavat lineaarisia tai haaroittuneita ketjurakenteita sekä verkkorakenteita kovalenttisilla sidoksilla (Jenkins *et al.* 1996).

Muoveja voidaan luokitella kestonuoveiksi ja kertamuoveiksi. Kestomuovien runko koostuu pitkistä hiiliketjuista, joissa voi esiintyä haarautuneisuutta, rengasrakenteita ja eri aineiden substituutiota (kuva 1). Kuvassa 1 esitetyistä muoveista PE, polypropeeni (PP), polyvinyylikloridi (PVC), polystyreeni (PS) ja PET ovat kestonuoveja. Kertamuoveista kuvassa 2 esitetty esimerkki on polyuretaani (PU), joka muodostaa jähmettyessään verkkorakenteen. (Zheng *et al.* 2005) Kestonuoveja voidaan lämmittää ja muovata uudelleen, kun taas kertamuovien kemiallinen rakenne on pysyvä eikä näitä voida enää muokata. Muovien kierrätys perustuu muovien uudelleenmuokkaukseen. (Ghosh *et al.* 2013; PlasticsEurope 2018)

Kaikki polymeerin ympäristön vaikutuksesta johtuvat fysikaaliset ja kemialliset muutokset määrittävät muovin hajoamiseksi. Muovien hajoaminen mikro-organismien erittämien entsyymien vaikutuksesta määrittävät biohajoamiseksi. (Swapnil *et al.* 2015) Muovien hajoamista ilman mikrobien tai elollisten tekijöiden vaikutusta kutsutaan abioottiseksi hajoamiseksi. Abioottista hajoamista on esimerkiksi lämmön tai valon aiheuttama hajoaminen. (Hakkarainen & Albertsson 2004)

Prosessi, jossa polymeeri voi hajota abioottisesti tai biologisesti monomeereikseen tai lyhyemmiksi polymeeriketjuiksi ja jäljellä olevat molekyylit pystyvät läpäisemään mikrobin solukalvon, kutsutaan depolymerisaatioksi. Mineralisaatiossa mikrobin metaboliareitin lähtöaineena olleet monomeerit tai polymeerit reagoivat solun sisällä niin, että lopputuotteina saadaan epäorgaanisia molekyylejä, kuten hiilidioksidia ja vettä. (Gu 2003)

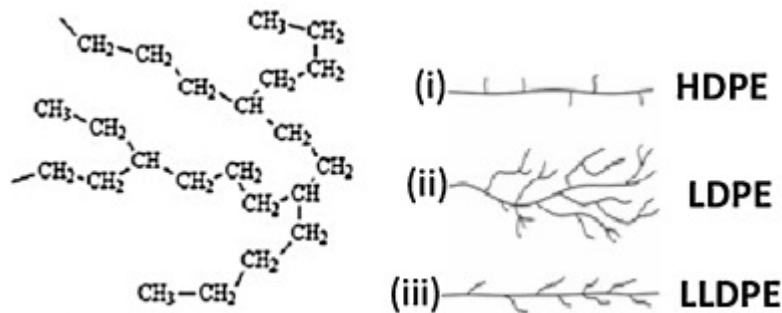


**Kuva 1:** Eri muovityyppien perusrakenteita. Oikealla on esitetty yleisimmistä synteettisistä muovilaaduista polyeteeni (PE), polypropeeni (PP), polyvinyylikloridi (PVC), polystyreeni (PS), polyeteenitereftalaatti (PET) ja polyuretaani (PU). Vasemmalla on esitetty helpommin hydrolysoituvista muoveista polyetylenisukkinaatti (PES), polyetyleeniglykoli (PEG), polyvinyylialkoholi (PVA) ja polylaktidi (PLA). Muokattu lähteistä (Wilkes & Aristilde 2017; Lee et al. 2019).

Toinen ominaisuus, jonka mukaan muoveja voidaan luokitella, on muovien kyky kestää ympäristön vaikutuksia. Hajoamattomiin muoveihin kuuluvat yleisesti käytetyt petrokemialliset polymeerit kuten, polyeteeni ja polypropeeni, joiden molekyylimassa voi vaihdella 12-6000 kD:n välillä (Ebnesajjad 2016). Hajoaviin muoveihin luokitellaan biopolymeerit, joiden molekyylimassa on keskimäärin hieman alhaisempi kuin synteettisten petrokemian polymeerien. (Ghosh et al. 2013) Esimerkiksi PLA:n keskimääräiseksi molekyylimassaksi on erään tutkimuksen yhteydessä määritetty 80 kD (Detyothin et al. 2013). Biopolymeereillä tarkoitetaan usein luonnossa esiintyviä pitkiä polymeerejä kuten ligniiniä ja DNA:ta. Tässä työssä biopolymeerillä tarkoitetaan uusiutuvista orgaanisista aineista valmistettuja polymeerejä kuten, kuvassa 1 esitettyä PLA:a, joita käytetään petrokemian polymeerien tapaan. (Yates & Barlow 2013)



Tässä työssä käsiteltävä polyeteeni valmistetaan eteenistä. Polyeteenin rakenne vaihtelee polymerisaatioreaktion olosuhteiden mukaan. Kuvassa 2 on esitetty polyeteenin variaatioita. Korkeatiheyksinen polyeteeni (HDPE) pakkautuu tiheimmin muodostaen kovemman materiaalin kuin matalatiheyksinen polyeteeni (LDPE), jonka polymeerirakenne on haaraisempi ja löyhempi. Lineaarinen matalatiheyksinen polyeteeni (LLDPE) on materiaaleista joustavin, koska sillä on eniten sivuketjuja, mutta ne ovat lyhyempiä kuin LDPE:n. (Zhang *et al.* 2004)



**Kuva 2:** Vasemmalla LDPE:n rakennekaava ja oikealla on havainnollistettu eri polyeteenityyppien rakenteita, lähteestä (Kumar Sen & Raut 2015).

Vaikka tässä työssä käsitellyt muovit luokitellaan hajoamattomiin muoveihin, petrokemiallisetkin muovit hajoavat abioottisesti ja biologisesti. Yleisimpien muovien hajoaminen kestää luonnossa satoja vuosia, koska niiden korkea molekyylimassa, kolmiulotteinen rakenne ja hydrofobinen luonne ovat epäsuotuisia mikrobeille (Hopewell *et al.* 2009; Swapnil *et al.* 2015).

## 2.1 Muovin abioottinen ja biologinen hajoaminen

Muovien biohajoamiseen vaikuttavat ympäristön olosuhteet, hajotettavan muovin ominaisuudet ja läsnä olevien mikrobien ominaisuudet (Moharir & Kumar 2019). Ympäristön olosuhteet vaikuttavat polymeerin ominaisuuksien lisäksi vallitsevaan mikrobipopulaatioon ja sen kasvuun (Swapnil *et al.* 2015). Korkea lämpötila ja kosteus, pH:n muutos sekä intensiivinen UV-säteily aiheuttavat kemiallista hajoamista, mikä lisää polymeerin hydrofiilisyyttä sekä heikentää polymeeriä (Singh & Sharma 2008; Swapnil *et al.* 2015).

Hajottavien entsyymien toimintaan vaikuttavat muovien ominaisuudet, kuten molekyylimassa ja muovin sulamislämpötila (Swapnil *et al.* 2015). Mitä pidempi polymeeriketju on, sitä vaikeampi mikrobien on sitä hajottaa (Moharir & Kumar 2019). On todettu, että po-

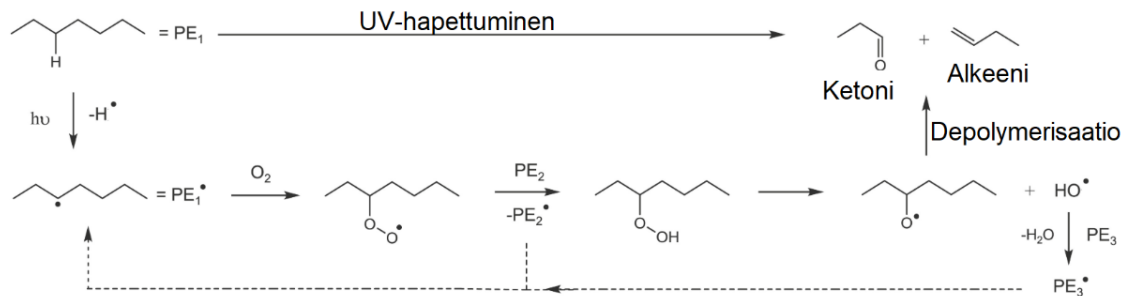
lymeerien molekyyli­massan ollessa vähemmän kuin 500 Da, mikrobit kykenevät hajotta­maan polymeerit nopeammin kuin suurempia polymeerejä (Gewert *et al.* 2015). Yksin­kertaistaen polymeerien sulamislämpötila kuvaa polymeerin rakenteen kemiallista sta­biiliutta. Mitä korkeampi sulamislämpötila on, sitä hankalampi mikrobien on hajottaa ky­seistä polymeeriä. (Swapnil *et al.* 2015) Polymeerit, joilla on sivuketjuja ovat vaikeammin hajotettavissa kuin suoraketjuiset polymeerit (Sharma 2018). Muovin lisäaineet, kuten bisfenoli A ja nonyyli­fenyyli voivat inhiboida hajoamista ja olla myrkyllisiä mikrobeille (En­frin *et al.* 2019).

Muoveihin voidaan lisätä polymeroinnin yhteydessä komponentteja, joilla pyritään hel­pottamaan muovin hajoamista. Lisäaine voi parantaa UV-valon absorptiota ja vähentää muovin hydrofobisuutta. Esimerkiksi polymeroinnissa käytetyn katalyytin jäänteet ja me­ tallit, kuten magnesium ja rauta, voivat toimia hajotusta edistävinä komponentteina. (Singh & Sharma 2008) Polyeteenin tapauksessa polymeerissä on vain vähän kemialli­ sia sidoksia, jotka voivat adsorboida UV-valoa, jolloin mahdollisella lisäaineella on mer­ kittävä vaikutus muovin hajoamisnopeuteen (Gewert *et al.* 2015). Lisäaineet katkaisevat pitkät hiilistä koostuvat ketjut pienemmiksi paloiksi ja kun lisäaineet yleensä irtoavat po­ lymeeristä helpommin, jäljelle jäävät polymeeriketjut ovat matalamman molekyyli­mas­ sansa ansiosta helpommin mikrobien hajotettavissa (Singh & Sharma 2008; Gewert *et al.* 2015).

Abioottinen esikäsitteily edistää biohajoamista. Esikäsitteily suoritetaan laboratoriotutki­ muksissa yleensä hapon, lämmön tai UV-valon avulla (Moharir & Kumar 2019). Luon­ nossa muovi hajoaa abioottisesti muun muassa auringon valon ja mekaanisen rasituk­ sen takia. Esikäsitteily voi madaltaa polymeerin molekyyli­massaa ja lisätä pinta-alaa, jo­ hon mikrobit voivat kiinnittyä (Singh & Sharma 2008). Abioottisen UV-valon aiheuttaman hajoamisen seurauksena muodostuvat karbonyyliryhmät (C=O) tekevät polymeeristä hydrofiilisemmän, jolloin mikrobien on helpompi reagoida polymeerin kanssa (Gewert *et al.* 2015).

Yksi polyeteenin merkittävimmistä abioottisista hajotusmekanismeista on valon avulla tapahtuva hapettuminen. Polyeteenin UV-esikäsitteily edistää polymeerin biohajotusta (Hadad *et al.* 2005; Rajandas *et al.* 2012; Esmaeili *et al.* 2013). Esimerkiksi *Bacillus*- luokkaan kuuluva *Brevibacillus borstelensis* -bakteeri oli hajottanut esikäsittelemätöntä LDPE-muovia noin 2,5 % ja UV-käsiteltyä muovia 6,2 % (Hadad *et al.* 2005). Kuvassa 3 esitetyssä mekanismissa UV-valon energian absorboituessa polyeteeniin sen energia saa hiilen ja vedyn välisen sidoksen katkeamaan, jolloin muodostuu vapaita radikaaleja.

Radikaalit mahdollistavat polymeeriketjun hajoamisen osiin ja monimutkainen ketjureak-  
tio loppuu vasta kun radikaalit ovat muodostaneet reagoimattoman yhdisteen. Epäpuh-  
taudet ja poikkeavuudet polymeerin rakenteessa lisäävät muovin alttiutta UV-hajotuk-  
selle, koska ne muodostavat yleensä matalaenergisiä sidoksia kuin puhtaan poly-  
eteenin sidokset. (Gewert *et al.* 2015)



**Kuva 3.** Polyeteenin UV-hapettumisen (photo-oxidation) mekanismi, jossa valon energi-  
alla ( $h\nu$ ) polymeeri katkeaa ja muodostaa vapaan radikaalin. Radikaalin muodostus aloit-  
taa monitahoisen reaktioketjun, joka on tähän kuvaan yksinkertaistettu päättymään de-  
polymerisaatioon. Radikaalireaktiot voivat johtaa myös polymeeriketjujen sitoutumiseen  
toisiinsa. Muokattu lähteestä (Enfrin *et al.* 2019).

Muovien biohajotuksessa mikrobit muodostavat biofilmin hajotettavan polymeerin pin-  
taan. Mikrobit voivat reagoida polymeeriketjun päässä sijaitsevien metyyliryhmien  
kanssa (Gewert *et al.* 2015). Polymeerit hydrolysoituvat mikrobien erittämien entsyymien  
vaikutuksesta, esimerkiksi *Pseudomonas spp.* tuottavat hydrolaaseja, jotka hajottavat  
polyeteeniä (Wilkes & Aristilde 2017; Ahmed *et al.* 2018). Hydrolyysissä polymeerin hii-  
lirunko katkeaa kahteen osaan. Entsyymit jatkavat hydrolyysiä, kunnes polymeeri on ha-  
jonnut monomeereikseen, jolloin mikrobi kykenee ottamaan molekyylin sisäänsä. Aero-  
bisissa olosuhteissa mikrobi käyttää happea elektroniakseptorina ja monomeerejä ravin-  
tona. (Ahmed *et al.* 2018)

Tarkkaa biohajotuksen mekanismia on vaikea määrittää mikrobien lajikirjon ja niiden ai-  
neenvaihdunnan monipuolisuuden sekä ympäristön vaikutusten ja reaktioiden hitauden  
takia. Tutkimuksissa on kuitenkin todettu abioottisesti muodostuneiden karbonyyli-  
ryhmien vähenevän, kun näyte on altistettu muovia hajottaville mikrobeille (Hakkarainen &

Albertsson 2004; Sudhakar *et al.* 2008). Karbonyyliryhmien vähenemisen on todettu indikoivan biohajoamista. Mitä enemmän abioottisesti muodostuneita karbonyyliryhmiä polymeerissä on ollut sitä enemmän biohajoamista on havaittu, jolloin on pyritty selvittämään miten mikrobit hyödyntävät karbonyyliryhmiä polymeerin hajottamiseen. Sudhakar *et al.* (2008) olettivat karbonyyliryhmien vähenevän joko Norrish-tyypin biohajoamisella, tai abioottisella esterin muodostumisella. Yksinkertaistaen Norrish-tyypin reaktiomekanismeissa karbonyyliryhmästä muodostuu kaksoissidos hiilien välille tai polymeeri katkeaa ja muodostuu radikaali. (Sudhakar *et al.* 2008)

Ligniiniä hajottavat entsyymit lakkaasi ja mangaani peroksidaasi (MnP) kykenevät hajottamaan myös polyeteeniä (Santo *et al.* 2013; Yuka *et al.* 1997). Lakkaasia erittävä *Rhodococcus ruber* (C208) käyttää polyeteeniä ainoana hiilen ja energian lähteenään (Sivan *et al.* 2006). Lakkaasin hapetusmekanismi perustuu sen kykyyn tuottaa vapaita radikaaleja (Mayer & Staples 2002). Entsyymien muodostamat radikaalit hajottavat muovia samoin kuin UV-valon muodostamat radikaalit (kuva 3).

Biohajottamiseen osallistuvat mikrobit muodostavat konsortiota, jotka toimivat yhdessä polymeerin hajottamiseksi. Vaikka useissa tutkimuksissa on löydetty yksittäisiä mikrobikantoja, jotka hajottavat tiettyä polymeeriä, yleensä biohajotukseen osallistuu suurempi joukko bakteereja, sieniä ja leviä. (Lucas *et al.* 2008) Polyeteeniä hajottavien konsortioiden toiminnasta on vielä vähän tietoa, mutta tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että konsortiot hajottavat muovia nopeammin kuin puhdasviljelmä (Esmaeili *et al.* 2013; Skariyachan *et al.* 2016).

## 2.2 Biohajoamisen analyysimenetelmiä

Biohajoaminen voidaan todeta näytteen massan pienenemisenä, mikrobien aktiivisuutena, hiilidioksidin vapautumisena, kappaleen muodon, fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä molekyyli­massan muutoksina (Singh & Sharma 2008). Näitä ominaisuuksia ja muutoksia voidaan mitata usealla eri menetelmällä, joista neljä on esitelty lyhyesti tässä luvussa (Raddadi & Fava 2019).

Gravimetrinen massan vähenemä on yleisin biohajoamisen määrittämiseen käytetty analyysimenetelmä. Tämä saattaa joskus antaa vääristyneitä tuloksia, koska materiaalista on voinut liueta muovien lisäaineita eikä polymeeriä ole biohajonnut. Biohajoamisen

pienet massan vähenemät aiheuttavat myös virhettä mittalaitteiden tarkkuudesta johtuen. Gravimetrisen analyysin kanssa tulisi käyttää jotain toista menetelmää, jotta biohajoamisesta voidaan olla varmoja. (Raddadi & Fava 2019)

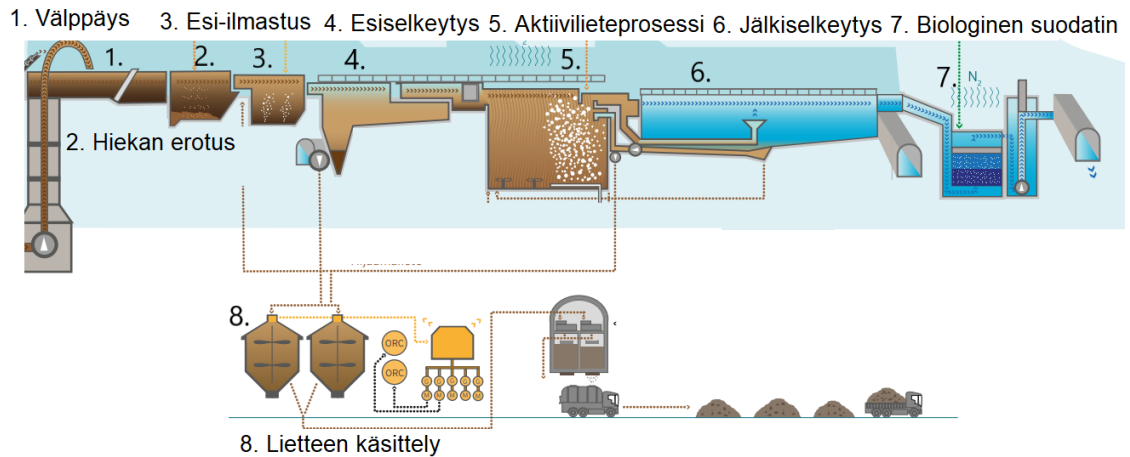
Termogravimetrinen analyysi mittaa materiaalin massan muutoksia kontrolloidussa ympäristössä lämpötilan muuttujana. Termogravimetrinen analyysin avulla polymeerin hajoaminen havaitaan materiaalin stabiilisuuden muuttuessa. Kun polymeeriketju on lyhyempi, sen sulamislämpötila on myös alhaisempi, jolloin hajoaminen näkyy stabiilisuuden muutoksena alhaisemmassa lämpötilassa kuin hajoamattoman kontrollin. Muovien lisäaineet vaikuttavat tämänkin analyysin tarkkuuteen. (Ge *et al.* 2018; Raddadi & Fava 2019)

Fourier-infrapunaspektroskopia on yleisesti biohajoamisen analysoinnissa käytetty menetelmä, jolla pystytään tunnistamaan polymeerissä tapahtuneita kemiallisia muutoksia. Menetelmällä voidaan tunnistaa esimerkiksi karbonyyliryhmien määrän muutos, jonka perusteella voidaan todeta polymeerin abioottinen hajotus ja biohajotus (Hakkarainen & Albertsson 2004). Näytteen sisältämä biomateriaali ja mahdolliset muovin lisäaineet voivat antaa harhaanjohtavia tuloksia. (Raddadi & Fava 2019)

Pyyhkäisyelektronimikroskopiaa (SEM) käytetään havainnollistamaan muovifilmien pinnan muutoksia sekä biofilmien muodostumista (Nowak *et al.* 2011). Pinnan halkeilu ja reikiintyminen kertovat hajoamisesta, mutta hajoamisen määrä pitää määrittää jollain muulla menetelmällä.

### **2.3 Muovit jätevedenpuhdistuksessa**

Jäteveteen päätyvä muovi on peräisin muun muassa kosmetiikasta, tekstiilien pesusta sekä hulevesistä (Talvitie *et al.* 2017; Miller *et al.* 2017). Viikinmäen jätevedenpuhdistamolle saapuvassa jätevedessä oli 380-680 mikroluokan partikkelia / litra, josta 97 % poistuu prosessista lietteen mukana (kuva 4). Jätevedestä poistetaan suuremmat muovin kappaleet välppäyksessä ja suurin osa mikromuovista laskeutuu lietteeseen biomassan mukana jälkiselkeytyksessä. Prosessin läpi purkuveden mukana mereen päätyy mikrooskaa 0,7-3,5 partikkelia / litra. (Talvitie *et al.* 2017) Erilaisilla mittausmenetelmillä ympäri maailmaa jätevedenpuhdistamoille tulevassa vedessä on havaittu 15-8000 mikromuovipartikkelia / litra (Sun *et al.* 2019).



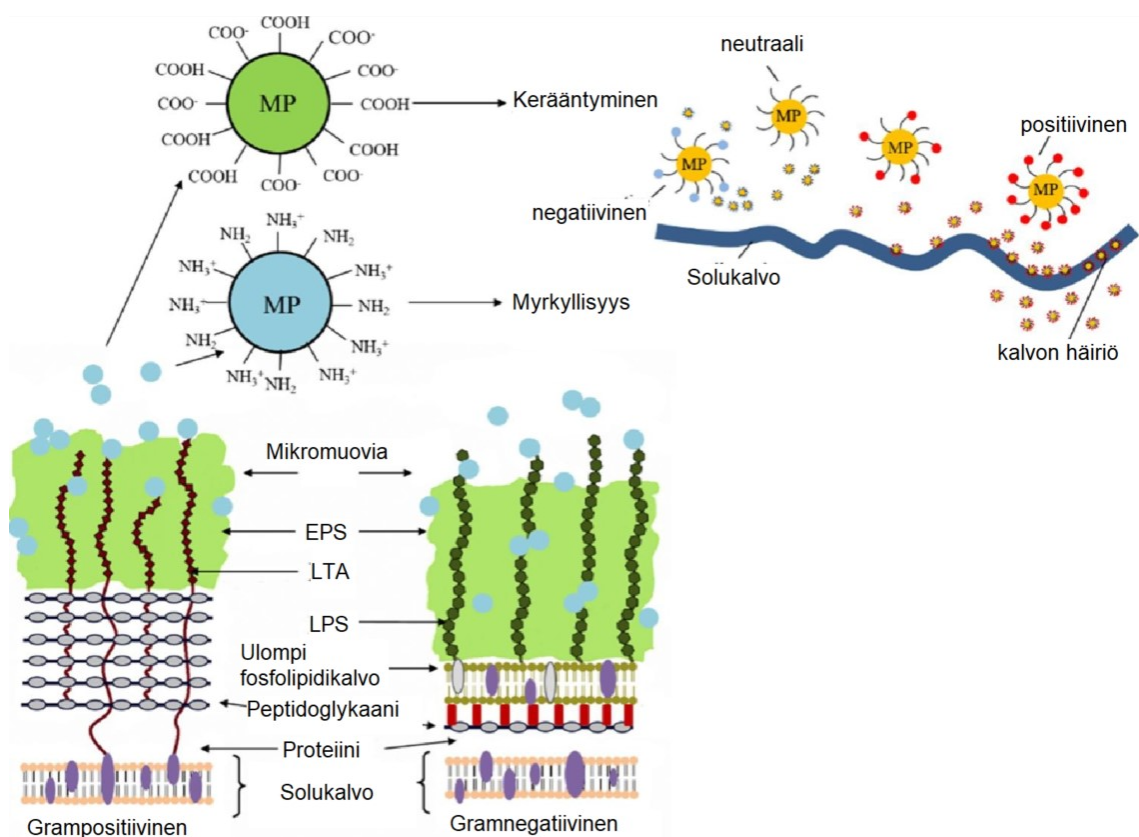
**Kuva 4:** Viikinmäen jätevedenpuhdistamon prosessikaavio: muokattu lähteestä (HSY 2016).

Mikromuovit ovat hydrofobisia ja negatiivisesti varautuneita (Zhang & Chen 2019). Hydrofobisuus saa mikromuovit kerääntymään yhteen (Enfrin *et al.* 2019). Negatiivisella pintavarauksella on vaikutusta koagulaatiossa, jolloin tarvitaan enemmän rauta- ja alumiini-ioneja (Zhang & Chen 2019). Negatiivisen pintavarauksen takia mikromuovien pintaan voi adsorboitua myös muita partikkeleita, mikä muuttaa flotaatiossa poistettavien partikkelien kokoa ja tiheyttä, jolloin niiden poistaminen on vaikeampaa (Enfrin *et al.* 2019). Mikromuovien pintaan voi adsorboitua myös toksisia kemikaaleja, jotka vaikuttavat haitallisesti myöhemmin jätevedenpuhdistusprosessissa tai lietteenkäsittelyprosessissa (Fu *et al.* 2018).

Mikromuovien on todettu pirstaloituvan pienemmiksi partikkeleiksi jätevedenpuhdistusprosessien aikana. Mekaaninen rasitus esimerkiksi hiekkasuodatuksessa saa mikromuovit hajoamaan. Muovi hajoaa, koska suodatuksessa käytetty hiekka on 10 kertaa kovempaa kuin PE-partikkelit. (Enfrin *et al.* 2019)

Biologiseen fosforin poistoon mikromuoveilla ei todettu olevan vaikutusta. Toisaalta mikromuovit häiritsevät typen poistoon osallistuvien mikrobien toimintaa ja kasvua (Atuanya *et al.* 2016). Eri varauksellisilla ja tyyppisillä partikkeleilla on vaihtelevia vaikutuksia jätevedenpuhdistusprosessiin. Partikkelien koolla on merkitystä mikromuovien aiheuttamaan vasteeseen erityisesti biologisissa prosesseissa. Kun partikkelit ovat kooltaan nanometrin luokkaa, ne pääsevät mikrobien soluseinässä olevien teikkohappojen ja lipopolysakkaridien väliin, kuten kuvassa 5 on esitetty. (Zhang & Chen 2019)

Nanopartikkelit voivat häiritä mikrobin aineenvaihduntaa ja solukalvon toimintaa. Bakteerien kalvoilla ja soluseinärakenteissa olevien entsyymien toiminta voi häiriintyä, kun muovipartikkelit pääsevät kertymään bakteerien ulkopinnalle (Caruso *et al.* 2018). Erityisesti nitrifikaatiossa ja denitrifikaatiossa oleelliset entsyymit toimivat bakteerin solukalvolla tai periplasmassa, jolloin bakteerien ympärille kertyneet muovipartikkelit voivat päästä kosketuksiin näiden tärkeiden entsyymien kanssa (kuva 5). Biofilmin bakteereita suojaava solun ulkoinen limakerros (EPS) ei estä kokonaan mikromuovien pääsyä bakteerin soluseinärakenteisiin, jolloin partikkelien ja entsyymien kontakti voi estää entsyymien toiminnan. Mikromuovit kykenevät vaikuttamaan helpommin yksittäisiin mikrobeihin, joilla ei ole biofilmin tuomaa suojaa. (Zhang & Chen 2019)



**Kuva 5:** Kuvan yläosassa on esitetty miten eri varaukselliset mikromuovipartikkelit (MP) vaikuttavat bakteerin soluseinärakenteisiin ja solukalvoon. Positiivisesti varautuneet partikkelit ovat myrkyllisiä bakteerien kalvorakenteille, koska ne aiheuttavat oksidatiivista stressiä ja muodostavat sidoksia sähköstaattisen vetovoimalla. Negatiivisesti varautuneet partikkelit kerääntyvät enemmän yhteen kuin muodostavat voimakkaita sidoksia bakteerin kalvorakenteiden kanssa, mutta voivat aiheuttaa bakteerin toiminnan häiriöitä ollessaan kosketuksissa bakteerin lipopolysakkaridien (LPS) ja lipoteikkohappojen (LTA) kanssa. Alempana on esitetty miten kuvassa siniset muovipartikkelit kiinnittyvät

*gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien lipopolysakkarideihin ja lipoteikkohappoihin. Bakteerien tuottama suojaava limakerros (EPS), kuvassa vaaleanvihreällä, ei estä kokonaan mikromuovien pääsyä lähelle bakteerin soluseinärakenteita. Muokattu lähteestä (Zhang & Chen 2019)*

Mikromuovi ei häiritse vain biologista typen poistoa vaan muovipartikkelit haittaavat myös jätevedenpuhdistuksessa syntyneen lietteen biologista käsittelyä. Mikromuovien näytettiin heikentävän mädätyksen metaanin tuottoa ja hidastavan metaanin tuoton alkamista, kun mikromuovia oli seoksessa 100-200 partikkelia / g-TS. (Zhang & Chen 2019) Myös yleisimpien synteettisten nanomuovien vaikutusta mädätykseen oli tutkittu lisäämällä keskimäärin 55 nm halkaisijalta olevia partikkeleita 0,2 g/l mädätyssubstraattiin. Metaanin tuotto (ml/g VS) laski 14,4 % ja maksimaalinen metaanin tuotto päivässä laski 40,7 %. Nanomuovin todettiin kiinnittyvän mädätyksen bakteerien solukalvoon ja häiritsevän niiden toimintaa. Tutkimuksessa todettiin myös mädätyksen mikrobiyhteisön muuttuvan nanomuovien johdosta. (Fu *et al.* 2018)



### 3. POLYETEENIÄ HAJOTTAVIEN JA JÄTEVEDEN- PUHDISTUKSEN AEROBISTEN MIKROBIEN KASVUOLOSUHTEET

#### 3.1 Tunnettujen polyeteeniä hajottavien mikrobien ominaisuuksia ja kasvuolosuhteita

Polyeteeniä hajottavia mikrobeja on tunnistettu runsaasti viimeisen 10 vuoden aikana. Mikrobeja on eristetty eri lähteistä kuten maa- ja vesinäytteistä sekä hyönteisten suolistosta (Raddadi & Fava 2019). Tässä luvussa käsitellään tunnettuja muovia hajottavia mikrobisukujen ja lajien ominaisuuksia sekä niiden suotuisia kasvuolosuhteita. Tämän luvun loppuun on koottu yhteenveto muovia hajottavista mikrobeista taulukkoon 1.

Aktinomykeetit tai aktinobakteerit ovat iso ryhmä bakteereja, joista osa kykenee hajottamaan muoveja (Sharma 2018). Ryhmän bakteerit ovat yleensä rihmoja muodostavia maaperän bakteereita (Madigan *et al.* 2017). Yksi aktinomykeetteihin kuuluva bakteeri on *Rhodococcus ruber* (Guevara *et al.* 2019).

*Rhodococcus*-suvun bakteerit ovat aerobisia, Garm-positiivisia ja niitä esiintyy laajasti maaperässä, vesistöissä, merissä ja jätevedessä (Guevara *et al.* 2019). Polyeteeniä energianaan ja hiilenlähteenään käyttävä *R. ruber* C208 eristettiin maasta, jonne oli haudattu maataloudessa käytettyjä katemuoveja (Orr *et al.* 2004). *Rhodococcus*-suvun bakteerit ovat hydrofobisia peptidoglykaaniin kiinnittyneiden pitkien rasvahappoketjujen, mykolihappojen, ansiosta (Madigan *et al.* 2017). Bakteerien hydrofobisuus on etu, koska nyt bakteeri kykenee kiinnittymään hydrofobiseen mikromuoviin helpommin. Suvun bakteerit ovat tunnettuja myös monipuolisista aineenvaihduntareiteistä ja niiden säätelystä. Monipuolisuutensa ansiosta ne pystyvät muokkaamaan monia ympäristömyrkyjä kuten aromaattisia hiilivetyjä ja torjunta-aineita (Guevara *et al.* 2019).

Osa *Rhodococcus*-suvun bakteereista erittää hajottavia entsyymejä solun ulkopuolelle, mikä on avainasemassa muovien hajotuksessa. Polyeteeniä hajottavan *R. ruber*-kannan erittämä entsyymi on lakkaasi, jota bakteeri kykenee erittämään enemmän, kun kuparia on läsnä. Kuparin lisääminen elatusaineeseen lisäsi *R. ruber*-bakteerin erittämää lakkaasin määrää ja entsyymin aktiivisuutta, mikä taas johti polyeteenin nopeampaan biohajoamiseen. (Santo *et al.* 2013) Ennen entsyymin tunnistamista sen toiminta havaittiin SEM-kuvissa paikallisena hajoamisena solujen ympärillä (Orr *et al.* 2004).

*Actinobacteria*-pääjaksoon kuuluvat *Microbacterium*-suvun bakteerit ovat Gram-positiivisia, keltaisia sauvoja, joita on eristetty muun muassa maaperästä, vedestä, jätevedestä ja sairaalaolosuhteista (Chorost *et al.* 2018). *Microbacterium paraoxydans* on vähemmän tunnettu polyeteeniä hajottava bakteeri ja se kuuluu samaan pääjaksoon *R. ruber*-bakteerin kanssa (Heera *et al.* 2010).

Kaatopaikalta eristetty *M. paraoxydans* tuottaa polyhydroksibutyraattia (PHB) ja biohajotavia polymeerejä hajottavaa depolymeraasia. PHB on mikrobien avulla tuotettava termoplastinen biopolymeeri, jolla on synteettisten muovien ominaisuuksia. Sayyed *et al.* (2019) mukaan bakteeri tuotti depolymeraasia 45 °C ainoana hiilen lähteenään PHB. Entsyymien aktiivisuutta lisäsivät  $\text{Ca}^{2+}$ - ja  $\text{Mg}^{2+}$ -ionit, mutta  $\text{Fe}^{2+}$ -ioni inhiboi entsyymien toimintaa. Tutkimuksessa todettiin entsyymien optimiolosuhteiksi 30 °C ja neutraali pH. (Sayyed *et al.* 2019) Se että, vaikuttaako *M. paraoxydans*-bakteerin erittämä entsyymi polyeteenin hajotukseen, ei selvinnyt edellä mainitussa tutkimuksessa.

*Firmicutes*-lahkoon kuuluva *Bacillus*-suku koostuu Gram-positiivisista, aerobisista tai fakultatiivisista anaerobisista bakteereista, joista osa muodostaa itiöitä (Madigan *et al.* 2017). Suvun bakteereja esiintyy laajasti maaperässä, kivissä, pölyssä, ilmassa, kasveissa sekä eläimissä (Achi & Halami 2016) ja niitä on eristetty myös mangrovesuolta (Chantarasiri 2015) ja matalista merivesistä (Sudhakar *et al.* 2008). *B. cereus*-bakteereita esiintyy myös jätevedenpuhdistuksen aktiivilieteprosessissa (Abzazou *et al.* 2015).

Useat *Bacillus*-suvun bakteerit erittävät hydrolyyttisiä entsyymejä ja voivat käyttää laajasti erilaisia hiilen ja energian lähteitä (Madigan *et al.* 2017). Bakteereista *B. cereus*, *B. sphaericus* (Sudhakar *et al.* 2008), *B. subtilis* ja *B. amylolyticus* (Swapnil *et al.* 2015) on raportoitu hajottavan polyeteeniä.

*Pseudomonas*-suku kuuluu *Proteobacteria*-pääjaksoon, joka on *Actinobacteria*- ja *Firmicutes*-pääjakson kaltainen suuri ryhmä bakteereita. *Proteobacteria*-pääjakson bakteerit ovat kaikki Gram-negatiivisia ja *Pseudomonas*-suku kuuluu *Gammaproteobacteria*-luokkaan. Suvun bakteerit ovat usein patogeenisiä ja tulevat toimeen hyvin vaihtelevissa olosuhteissa (Madigan *et al.* 2017). *Pseudomonas*-suvun bakteereja esiintyy laajasti maaperässä, vesistöissä ja osa niistä toimii myös denitrifikaatiossa jätevedenpuhdistamolla (Carlson & Ingraham 1983).

*Pseudomonas aeruginosa* on hyvin tunnettu biofilmiä muodostava fakultatiivinen anaerobi (Madigan *et al.* 2017). Useat suvun bakteereista kykenevät hajottamaan muovia. Eri bakteerit voivat hajottaa lähes kaikkia käytetyimmistä muovilaaduista. Eri muovilaatujen hajottamiseen tarvittavat solunulkoiset entsyymit vaihtelevat lajeittain. Polyeteeniä hajottavat *Pseudomonas*-suvun bakteerit erittävät hydrolaaseja, jotka katkaisevat polymeeriketjun. (Wilkes & Aristilde 2017)

*Enterobacter* spp. ja *Pantoea* spp. ovat Gram-negatiivisia fakultatiivisia aerobeja, jotka kuuluvat *Gammaproteobacteria*-luokkaan. Aikaisemmin *Pantoea*-suku on kuulunut *Enterobacteria*-sukuun. (Wang *et al.* 2017) *Enterobacter*-suvun bakteerit ovat yleisiä vedessä, jätevedessä ja tasalämpöisten eläinten ruuansulatuksessa (Madigan *et al.* 2017).

Eräässä tutkimuksessa *Enterobacter* spp. ja *Pantoea* spp. bakteerit oli eristetty muovilla saastuneesta maaperästä Intiasta. Kyseisessä tutkimuksessa bakteerit muodostivat konsortion, joka hajotti LDPE:ä tehokkaammin kuin kyseiset bakteerit puhdasviljelmässä. Tutkimuksessa havaittiin myös, että bakteerit kasvoivat sekä hajottivat polyeteeniä tehokkaimmin 45 °C ja pH:n ollessa 8,5. Konsortion rooleja ei määritelty tässä tutkimuksessa. (Skariyachan *et al.* 2016)

**Taulukko 1:** Yhteenveto polyeteeniä hajottavista mikrobeista jätevedessä. ”-” = ”Ei määritetty”

Mikrobi	LDPE/ HDPE	Tutkimusmenetelmä	Entsyymi/ tyyppi	Kokeen kesto	Muovin massan vä- henemä
<i>Microbacterium paraoxydans</i> ja <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>1</sup>	LDPE	Bakteerit sopeutettu typpihappo- käsiteltyyn muoviin 2 kk.	PHB depoly- meraasi Hydrolaasi	60 d	61.0% ja 50.5%
<i>Rhodococcus ruber</i> (C208) <sup>2</sup>	LDPE	Näyte kalvoa, M = 191 kD	Lakkaasi	56 d	7,5 %
<i>Comamonas</i> , <i>Delftia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> <sup>3</sup>	LDPE	Näyte kalvoa, M = 191 kD	-	90 d	0 %, mutta kemiallisia muutoksia
<i>Bacillus</i> spp. <sup>4,5,6</sup> <i>Bacillus cereus</i>	LDPE	Inkubointi eri maanäytteissä	Oksidoreduk- taasi, MnP ja lakkaasi	225 d	0,28%
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> ja <i>Aspergillus niger</i> <sup>7</sup>	LDPE	Inkubointi maanäytteissä UV-käsitelty ja käsittelemätön näyte	-	126 d	29,5 % (UV) ja 15,8 %
2 <i>Enterobacter</i> sp. ja 1 <i>Pantoea</i> sp. <sup>8</sup>	LDPE	Inkubointi maljoilla	-	120 d	81 % (kalvo) 38 % (pelletti)

1.(Rajandas *et al.* 2012) 2. (Sivan *et al.* 2006) 3. (Peixoto *et al.* 2017) 4. (Nowak *et al.* 2011) 5. (Sharma 2018) 6. (Sudhakar *et al.* 2008) 7.(Esmaeili *et al.* 2013) 8. (Skariyachan *et al.* 2016)

### 3.2 Jätevedenpuhdistuksen biologisten prosessien olosuhteet

Jätevedenpuhdistuksessa hyödynnetään jätevedessä jo valmiiksi olevia mikrobeja, joiden populaatiota muokataan suosimalla flokkeja muodostavia mikrobeja. Aktiivilieteprosessissa mikrobit käyttävät ravinnokseen jäteveden sisältämiä orgaanisia yhdisteitä ja muodostavat hieman vettä raskaamman lietteen, joka voidaan poistaa vedestä laskeuttamalla (kuva 4). (Davis 2010) Aktiivilieteprosessi toteutetaan kierrättämällä jätevettä ilmastusaltaasta ilmastamattomaan altaaseen, jotta nitrifikaatiolla ja denitrifikaatiolla saadaan mahdollisimman suuri osa typpeä poistettua vedestä (HSY 2016). Aktiivilieteprosessissa suurin osa jäteveden mikromuoveista laskeutuu biomassan mukana lietteeseen ja sitä kautta päätyy lietteen jatkokäsittelyyn (Talvitie *et al.* 2017).

Jätevedenpuhdistusprosessin toiminnan kannalta oleellista on luoda flokinmuodostajille, esimerkiksi *Pseudomonas*- ja *Bacillus*-suvun bakteereille, suotuisimmat olosuhteet kuin rihmaa muodostaville, esimerkiksi *Rhodococcus*-suvun bakteereille, jotka kilpailevat orgaanisesta aineesta. Flokkeja muodostavat bakteerit kasvavat nopeammin kuin rihmaa muodostavat bakteerit, kun orgaanisen aineen konsentraatio on korkeampi. Toinen flokkeja muodostavien bakteerien etu on kyky hyödyntää nitraattia, nitriittiä sekä varastoida polyfosfaatteja. (Davis 2010)

Nitrifikaatiossa bakteerit hapettavat epäorgaaniset typpiyhdisteet ammoniakkin ( $\text{NH}_4^+$ ) ja nitriitin ( $\text{NO}_2^-$ ) nitraatiksi ( $\text{NO}_3^-$ ). Nitrifikaatiobakteereja esiintyy laajasti maaperässä, vesistöissä, jätevesissä ja merissä. Bakteerisuvuista *Nitrosomonas* ja *Nitrobacter* kykenevät nitrifikaatioon. (Madigan *et al.* 2017) Nitrifikaatio on hapellinen prosessi, mitä jätevedenpuhdistamolla ilmastetaan, jolloin myös hapellisilla muovia hajottavilla bakteereilla on mahdollisuus kasvaa prosessissa.

Denitrifikaatiossa bakteerit tuottavat hapettomissa oloissa nitraatista ja nitriitistä typen oksideja ja typpikaasua. *Pseudomonas*-suvussa on vahvoja denitrifikaatiobakteereita, joista esimerkiksi *P. stutzeri* kykenee täydelliseen denitrifikaatioon (Madigan *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2011). Vaikka denitrifikaatio tapahtuu hapettomissa olosuhteissa, denitrifikaatiobakteerit kasvavat myös happipitoisissa oloissa.

Jätevedenpuhdistamolla biologisten prosessien veden lämpötila vaihtelee välillä 9-18 °C (HSY 2016). Yleensä laboratoriotutkimuksissa käytetään korkeampia lämpötiloja mikro-

bien kasvattamiseksi nopeammin, mutta jätevedessä yleisesti esiintyvät mikrobit kasvavat myös alemmissa lämpötiloissa (Skariyachan *et al.* 2016). Yleisesti lämpötilan lasku hidastaa mikrobien kasvua. Jätevedenpuhdistamolla pH pidetään suunnilleen neutraalina, jotta vältetään putkistokorroosiota ja neutraali pH on suosiollinen myös biologisissa prosesseissa (Davis 2010).

## 4. MUOVIA HAJOTTAVIEN MIKROBIEN SOVELTUMINEN JÄTEVEDENPUHDISTUKSEEN

Muovijätteen yksi kestävimmistä käsittelyvaihtoehdoista on mikrobien avulla toteutettava hajottaminen. Mikrobit hajottavat polymeeriketjun tuottamatta ympäristölle vaarallisia sivutuotteita. (Moharir & Kumar 2019) Suurin osa tässä työssä käsitellyistä mikrobeista esiintyy jätevedessä, joten kasvuolosuhteiden valossa muovin hajottaminen olisi mahdollista. Esimerkiksi *Pseudomonas*-suvun bakteereista osa osallistuu typen poistoon ja *Enterobacter*-suvun bakteereita esiintyy jätevedessä muuten yleisesti (Skariyachan *et al.* 2016; Madigan *et al.* 2017).

Mikrobien hyödyntäminen kuvan 4 mukaisessa jätevedenpuhdistusprosessissa mikro-muovin hajottamiseen on erittäin haastavaa. Jätevesi virtaa koko puhdistusprosessin läpi noin 23 tunnissa (HSY 2016). Lietteen mukana laskeutuneesta muovista osa voi pysyä puhdistusprosessissa muutamia päiviä lietteen palautuskierron takia, mutta aika ei kuitenkaan riitä muovin hajottamiseen. Muovia hajottavilta mikrobeilta on tutkimusten mukaan kulunut vähintään 2 kuukautta hajottaa suunnilleen noin puolet saatavilla olevasta muovista. Muovia hajottavat mikrobit kuitenkin pystyisivät kasvamaan aktiivilieteprosessissa lietteen palautuskierron takia, mutta mikrobien kyky hajottaa muovia heikkenee, kun ympäristössä on paljon muuta orgaanista ainetta (Nauendorf *et al.* 2016).

Muovin hajotusnopeus laskee, kun mikrobeilla on helpommin hyödynnettävissä olevaa ravintoa, kuten jätevedessä olevaa orgaanista ainetta. Muovien hajottaminen sopivan kokoisiksi molekyyleiksi vaatii mikrobeilta solun ulkopuolelle eritettävien entsyymien syntetisointia, mikä vaatii huomattavasti enemmän aikaa ja energiaa. (Madigan *et al.* 2017) On myös todettu, että muovia hajottavien mikrobien hydrofobisuus kasvaa, kun niiden ympäristössä ei ole hiiltä (Guevara *et al.* 2019). Näin orgaaninen hiili vähentää biofilmin muodostusta muovin pinnalle (Nauendorf *et al.* 2016).

Samojen mikrobilajien eri kannat hajottavat muovia huomattavasti vaihtelevilla nopeuksilla (Orr *et al.* 2004). Tutkimuksissa eristetyt mikrobit olivat altistuneet muoveille pitkään, jolloin mikrobien metabolia oli suuntautunut muovien hyödyntämiseen vaihtoehdoisten aineiden sijasta. Tällä hetkellä jätevedessä olevilla mikrobeilla ei ole tarvetta hyödyntää muovia, vaan saatavilla on runsaasti muita orgaanisia aineita sekä typen ja fosforin yhdisteitä. (Hadad *et al.* 2005; Chantarasiri 2015; Skariyachan *et al.* 2016)

Muovia hajottavista mikrobeista *Pseudomonas*-suvun bakteereilla on kolme erittäin hyödyllistä ominaisuutta muovien hajottamiseen jätevedenpuhdistamolla: erinomainen kyky muodostaa biofilmejä, monipuolinen metabolia erilaisten muovien hajotukseen sekä runsas esiintyminen jätevedenpuhdistamon aktiivilieteprosessissa (Wilkes & Aristilde 2017). Muovien hajottamisen kannalta oleellista olisi saada muu orgaaninen aines erilleen muoveista ja muoveja hajottavista mikrobeista.

*R. ruber*-bakteerilla on myös hyviä ominaisuuksia muovien hajottamiseen jätevedessä. Se kykenee oikeissa olosuhteissa olemaan tarpeeksi hydrofobinen muodostamaan biofilmin polyeteenin pinnalle ja sitä esiintyy jätevesissä. (Madigan *et al.* 2017) Valitettavasti *R. ruber* on rihmaa muodostava bakteeri, mikä on epäsuotuisa mikrobityyppi aktiivilieteprosessille. Jätevedenpuhdistusprosessissa rihmaa muodostavat mikrobit ovat haitaksi, koska ne eivät laskeudu selkeytyksessä pohjalle vaan jäävät kellumaan veden pinnalle, jolloin puhdistusprosessi ei toimi tarkoituksenmukaisesti. (Davis 2010)

Mikromuovien hajotuksen haasteista huolimatta nykyinen jätevedenpuhdistusprosessi poistaa suurimman osan mikromuovista lietteeseen (Talvitie *et al.* 2017). Lietteestä mikromuovien hajoamista on vielä vaikeampi seurata kuin jätevedestä, mutta lietteen käsittelyssä viipymät olisivat huomattavasti pidempiä, kuin jätevedenpuhdistuksessa. Esimerkiksi mädättämisen viipymä on noin 14-17 päivää ja mädätysjäännöksen kompostointi voi kestää noin vuoden (HSY 2016). Lietteen käsittelyn aikana mikrobeilla olisi aikaa hajottaa muovia, mutta olosuhteet muuttuvat prosessien välillä runsaasti, mikä aiheuttaisi mikrobeille sopeutumishaasteita.

Muovin biohajotus perustuu erilaisten entsyymien katalysoimiin depolymerisaatioreaktioihin. Tulevaisuudessa mikromuovien hajottamista jätevedestä voitaisiin edistää prosessimuutoksilla ja mahdollisesti hyödyntämällä muovia hajottavien mikrobien erittämiä entsyymejä tehokkaammin. Biohajotusta helpottavien muovin lisäaineiden käyttö suuremmissa mittakaavassa voisi myös edistää mikromuovien hajottamista. Tarkempi tuntemus mikrobien muodostamista konsortioista voisi helpottaa mikrobien biohajotuksen optimointia. Vielä tarvitaan lisää tutkimuksia ja innovaatioita mikromuovien aiheuttaman ongelman ratkaisemiseksi.



## 5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, onko mikromuovia mahdollista hajottaa mikrobien avulla jätevedenpuhdistuksen yhteydessä. Tutkimus suoritettiin vertailemalla polyeteeniä hajottavien mikrobien ominaisuuksia ja kasvuolosuhteita nykyisen jätevedenpuhdistamon olosuhteisiin. Työssä havaittiin usean muovia hajottavan mikrobin esiintyvän jätevedessä, mutta jätevedenpuhdistusprosessi ei tällä hetkellä suosi muovin hajotusta, koska mikrobeille on tarjolla helpommin hyödynnettävää ravintoa.

Mikromuovien biohajottaminen on haastavaa, koska suuri osa muoveista on erittäin stabiileja. Työssä havaittiin, että polyeteenin hydrofobisuus, pääasiassa hiilestä koostuva rakenne ja suuri molekyyli massa tekevät materiaalista erittäin kestävä. Polyeteeni hajoaa kuitenkin abioottisesti esimerkiksi UV-valon energialla syntyneiden radikaalireaktioiden takia. Radikaalireaktiot ovat monimutkaisia ketjureaktioita, jotka voivat johtaa esimerkiksi karbonyyliryhmien syntyyn tai polymeeriketjun katkeamiseen. Abioottisen hajoamisen seurauksena muodostuvat funktionaaliset ryhmät ja lyhyemmät sekä hydrofiilisemmät polymeeriketjut mahdollistavat tehokkaamman biohajotuksen.

Mikrobit muodostavat biofilmin polymeerin pinnalle ja hajottavat polyeteeniä solun ulkopuolelle eritettävien entsyymien avulla. Entsyymit vaihtelevat mikrobilajien mukaan, mutta tässä työssä tutkittujen mikrobein erittämät entsyymit hydrolysoivat polymeerin tai muodostavat radikaaleja, joiden reaktioiden seurauksena polymeeriketju katkeaa. Tarkkaa biohajoamisen mekanismia ei toistaiseksi tunneta, koska muovia hajottavien mikrobien lajikirjo on laaja, hajotusreaktiot ovat hitaita ja ympäristön olosuhteet vaikuttavat mikrobien aineenvaihduntaan huomattavasti.

Jätevedenpuhdistusprosessissa mikromuovit voivat häiritä biologista typenpoistoa. Erittäin alle 1 µm halkaisijaltaan olevien nanomuovien on todettu häiritsevän mikrobien aineenvaihduntaa ja se on havaittu typenpoiston tehokkuuden laskuna. Mikromuovit häiritsevät myös mädätyksen metaania tuottavien mikrobien toimintaa, koska metaanin tuoton oli havaittu laskevan mikromuovien pitoisuuden kasvaessa.

Tunnettujen polyeteeniä hajottavien mikrobein kasvuolosuhteet soveltuvat hyödynnettäväksi jätevedenpuhdistuksessa, mutta työn tulosten perusteella tehokas muovien bioha-

jotus edellyttää muovien ja muun orgaanisen ravinnon erottamisen. Vielä tarvitaan lisätutkimuksia ja innovaatioita ennen kuin mikromuoveja voidaan hajottaa jätevedestä mikrobien avulla.

# LÄHTEET

Abzazou, Salvadó, Bruguera-Casamada, Simón, Lardín and Araujo (2015) Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.22(15), s. 11446-11455.

Achi & Halami (2016). Chapter 43 - Antimicrobial Peptides from *Bacillus spp.*: Use in Antimicrobial Packaging. Academic Press. *Antimicrobial Food Packaging*. s. 527 -537

Ahmed, Shahid, Azeem, Rasul, Shah, Noman, Hameed, Manzoor, N., Manzoor, I. and Muhammad (2018) Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.25(8), s. 7287-7298.

Albertsson(1980). The shape of the biodegradation curve for low and high density polyethenes in prolonged series of experiments. *European Polymer Journal*. Vol.16(7). s. 623-630

Atuanya, Udochukwu and Dave-Omoregie (2016) Bioavailability and Toxicity of Plastic Contaminants to Soil and Soil Bacteria. *Microbiology Research Journal International*. s. 1-8.

Carlson and Ingraham (1983) Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.45(4), s. 1247-1253.

Caruso, Pedà, Cappello, Leonardi, La Ferla, Lo Giudice, Maricchiolo, Rizzo, Maimone, Rappazzo, Genovese and Romeo (2018) Effects of microplastics on trophic parameters, abundance and metabolic activities of seawater and fish gut bacteria in mesocosm conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.25(30), s. 30067-30083.

Chantarasiri (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. Vol.41(3). s. 257-264

Chorost, Smith, Hutter, Ong, Stam, McGann, Hinkle, Schaecher and Kamau (2018) Bacteraemia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with chronic kidney disease, refractory hypertension and sarcoidosis. *JMM case reports*. Vol.5(11), s. 5169.

Davis (2010) WASTEWATER MICROBIOLOGY. *Water and Wastewater Engineering: Design Principles and Practice*. New York: McGraw-Hill Education. Luku 22.

Detyothin Selke, Narayan, Rubino, and Auras (2013). Reactive functionalization of poly(lactic acid), PLA: Effects of the reactive modifier, initiator and processing conditions on the final grafted maleic anhydride content and molecular weight of PLA. *Polymer Degradation and Stability*. Vol.98(12). s. 2697 -2708

Ebnesajjad (2016) Introduction to Plastics, in Baur, Ruhrberg and Woishnis (eds.) *Chemical Resistance of Engineering Thermoplastics*. William Andrew Publishing, s. 1022.

Enfrin Dumée, and Lee (2019). Nano/microplastics in water and wastewater treatment processes – Origin, impact and potential solutions. *Water Research*. Vol.161. s. 621 -638

Esmaeili, Pourbabaee, Alikhani, Shabani and Esmaeili (2013) Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *PLOS ONE*. Vol.8(9), s. e71720.

Fu, Ding, Zhang, Li, Zhu, Yuan, and Zou (2018). Exposure to polystyrene nanoplastic leads to inhibition of anaerobic digestion system. *Science of The Total Environment*. Vol.625. s. 64-70

Ge, Chen, Li, Liu, Ouyang, Peng and Zhang (2018). Hemicellulose structural changes during steam pretreatment and biogradation of *Lentinus edodes*. *Arabian Journal of Chemistry*. Vol.11(6). s. 771-781

Gewert, Plassmann and MacLeod (2015) Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*. Vol.17(9), s. 1513-1521.

Geyer, Jambeck and Law (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. Vol.3(7).

Ghosh, Pal and Ray (2013) Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.20(7), s. 4339-4355.

Gu (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol.52(2). s. 69-91

Guevara, Castillo Lopez, Alonso, Perera and Navarro-Llorens (2019) New insights into the genome of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *BMC Genomics*. Vol.20.

Hadad, Geresh and Sivan (2005) Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of applied microbiology*. Vol.98(5), s. 1093-1100.

Hakkarainen and Albertsson (2004) Environmental Degradation of Polyethylene. *Adv Polym Sci*. s. 177-199.

Heera, Sivachandran, Kathiresan, Yin and Ravichandran (2010) *Microbacterium paraoxydans* strain AIMST H3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ185284?report=genbank> (Viitattu: 26.11.2019).

Hopewell, Dvorak and Kosior (2009) Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. Vol.364(1526), s. 2115-2126.

HSY (2016) Viikinmäen jätevedenpuhdistamo. Saatavissa: <https://www.hsy.fi/fi/asiantuntijalle/vesihuolto/jatevedenpuhdistus/Viikinmaki/Sivut/default.aspx> (Viitattu: 4.12.2019).

Jenkins, Kratochvíl, Stepto and Suter (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996) *Pure and Applied Chemistry*. Vol.68. s. 2287

Kumar Sen & Raut (2015). Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Vol.3(1). s. 462-473

Lee, Kim, Song and Hyun (2019) Characterization of the Effect of Clay on Morphological Evaluations of PLA/Biodegradable Polymer Blends by FT-Rheology. *Macromolecules*. Vol.52(20), s. 7904-7919.

Lucas, Bienaime, Belloy, Queneudec, Silvestre and Nava-Saucedo (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*. Vol.73(4). s. 429-442

Madigan, Bender, Buckley, Sattley and Stahl (2017) *Brock Biology of Microorganisms*, Global Edition. 15th edn. Harlow, United Kingdom: Pearson Education Limited. s. 1064

Mayer & Staples (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. Vol.60(6). s. 551-565

Miller, Watts, Winslow, Galloway and Barrows (2017). Mountains to the sea: River study of plastic and non-plastic microfiber pollution in the northeast USA. *Marine Pollution Bulletin*. Vol.124(1). s. 245-251

Moharir and Kumar (2019) Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. Vol.208, s. 65-76.

Nauendorf, Krause, Bigalke, Gorb, Gorb, Haeckel, Wahl and Treude (2016). Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*. Vol.103(1). s. 168-178

Nowak, Pająk, Drozd-Bratkowicz and Rymarz (2011). Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol.65(6). s. 757-767

Orr, Hadar and Sivan (2004) Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.65(1), s. 97-104.

Otake, Kobayashi, Asabe, Murakami, and Ono (1995) Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol.56(13), s. 1789-1796.

Peixoto, Silva and Krüger (2017). Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*. Vol.324. s. 634-644

PlasticsEurope (2018) Plastics the facts 2018 AF web. Saatavissa: [https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics\\_the\\_facts\\_2018\\_AF\\_web.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf) (Viitattu: 20.10.2019).

Raddadi & Fava (2019). Biodegradation of oil-based plastics in the environment: Existing knowledge and needs of research and innovation. *Science of The Total Environment*. Vol.679. s. 148-158

Rajandas, Parimannan, Sathasivam, Ravichandran and Su Yin (2012). A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing*. Vol.31(8). s. 1094-1099

Santo, Weitsman and Sivan (2013). The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol.84. s. 204-210

Sayyed, Wani, Alyousef, Alqasim, Syed and El-Enshasy (2019) Purification and kinetics of the PHB depolymerase of *Microbacterium paraoxydans* RZS6 isolated from a dumping yard. *PLoS One*. Vol.14(6), s. e0212324.

Sharma (2018) Bioremediation of Polythenes and Plastics: A Microbial Approach, in Prasad and Aranda (eds.) *Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology*. Cham: Springer International Publishing, s. 97-114.

Singh & Sharma (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. Vol.93(3). s. 561-584

- Sivan, Szanto and Pavlov (2006) Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.72(2), s. 346-352.
- Skariyachan, Manjunatha, Sultana, Jois, Bai and Vasist (2016) Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene. Environmental Science and Pollution Research. Vol.23(18), s. 18307-18319.
- Sudhakar, Doble Murthy and Venkatesan (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.61(3). s. 203-213
- Sun, Dai, Wang, van Loosdrecht and Ni (2019). Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. Water Research. Vol.152. s. 21-37
- Swapnil, Amit, Mahendra Dudhare and Vikram (2015) Microbial Degradation of Plastic: A Review. Journal of Biochemical Technology; Komatipalli. Vol.6(2), s. 952-961.
- Talvitie, Mikola, Setälä, Heinonen and Koistinen (2017). How well is microlitter purified from wastewater? – A detailed study on the stepwise removal of microlitter in a tertiary level wastewater treatment plant. Water Research. Vol.109. s. 164-172
- Wang, Wang, J. and Jing (2017) Comparative Genomic Analysis Reveals Organization, Function and Evolution of *ars* Genes in *Pantoea* spp. Frontiers in Microbiology. Vol.8, s. 471.
- Wilkes and Aristilde (2017) Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. Journal of applied microbiology. Vol.123(3), s. 582-593.
- Yates & Barlow (2013). Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review. Resources, Conservation and Recycling. Vol.78. s. 54-66
- Yoshida, Hiraga, Takehana, Taniguchi, Yamaji, Maeda, Toyohara, Miyamoto, Kimura and Oda (2016) A bacterium that degrades and assimilates polyethylene terephthalate. Science. Vol.351(6278), s. 1196.
- Yuka, Yuji and Tomoaki (1997) Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. The Japan Wood Research Society. (44), s. 222-229.
- Zhang J., Wu, Hao and Yu (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. Bioresource Technology. Vol.102(21). s. 9866-9869
- Zhang Z. and Chen (2019) Effects of microplastics on wastewater and sewage sludge treatment and their removal: A review. Chemical Engineering Journal. s. 122955.
- Zhang, X.M., Elkoun, Aji and Huneault (2004) Oriented structure and anisotropy properties of polymer blown films: HDPE, LLDPE and LDPE. Polymer. Vol.45(1), s. 217-229.
- Zheng, Yanful and Bassi (2005) A Review of Plastic Waste Biodegradation. Critical reviews in biotechnology. Vol.25(4), s. 243-50.