

**Tekniikan kandidaatintyö**

**Mikrobien hyödyntäminen muovien  
hajottamisessa**

Lappeenranta 2021

Emma Lippojoki

Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto LUT

LUT School of Engineering Science

Kemiantekniikan koulutusohjelma

# **Mikrobien hyödyntäminen muovien hajottamisessa**

Emma Lippojoiki

Tekniikan kandidaatintyö 2021

Työn ohjaaja: Katja Kuukka

## **Tiivistelmä**

Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto LUT

LUT School of Engineering Science

Kemiantekniikka

Emma Lippojoiki

### **Mikrobien hyödyntäminen muovien hajottamisessa**

Kandidaatintyö, kevät 2021

45 sivua, 13 kuvaa, 2 taulukkoa

Työn ohjaaja: Katja Kuukka

Hakusanat: polymeeri, muovi, hajoaminen, mikrobi, bakteeri, sieni, biohajoavuus, entsyymi

Muovit ovat osa kaikkien ihmisten elämää ja ne ovat yksi maailman suurimmista ympäristö-ongelmista. Perinteisten muovien kierrätysmenetelmien rinnalle on nousemassa uusi biotekninen kierrätys, eli muovien hajottaminen mikrobien avulla. Menetelmän avulla suurin osa muoveista olisi mahdollista kierrättää takaisin käyttöön, koska toiminta perustuu polymeeriketjun uudelleenrakentamiseen. Tällöin myös muovien ominaisuudet säilyisivät ennallaan. Tutkimukset ovat löytäneet useita hajottavia mikrobeja. Tällaisia ovat bakteerisuvut *Pseudomonas* ja *Bacillus*. Kyseiset bakteerisuvut ovat tunnettuja useiden eri muovityyppien hajottamisessa.

Muovin hajoaminen mikrobien avulla tapahtuu vaiheittain. Aluksi abioottinen tekijä haurastuttaa muovia ja katkoo polymeerin pitkiä ketjuja. Mikrobit pystyvät hyödyntämään pienempiä polymeeriketjuja tehokkaammin ja hajottavat nämä entsyymien avulla monomeereiksi. Reaktiota kutsutaan depolymeroinniksi. Syntyneistä monomeereistä voidaan rakentaa uusia polymeerejä, joista muovit koostuvat.

Työssä tutkitaan erityisesti biohajoamattomien muovien hajoamista mikrobien sekä entsyymien avulla. Tutkitut muovilaadut ovat PE, PET, PVC, PP, PUR ja PS. Työssä tarkastellaan kyseisiä muovilaatuja ja näitä hajottavia mikrobeja, reaktiomekanismia sekä teollisia hankkeita, jotka hyödyntävät muovien kierrättämiseen mikrobeja.

## Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Reaktiomekanismi .....</b>	<b>6</b>
	2.1 Biohajoaminen .....	7
	2.2 Assimilaatio ja mineralisaatio .....	9
<b>3</b>	<b>Muovilaadut .....</b>	<b>10</b>
	3.1 Polyeteeni .....	11
	3.1.1 Korkeatiheyksinen polyeteeni .....	13
	3.1.2 Matalatiheyksinen polyeteeni .....	14
	3.2 Polyteenitereftalaatti.....	15
	3.3 Polyvinyylikloridi .....	17
	3.4 Polystyreeni.....	19
	3.5 Polypropeeni .....	21
	3.6 Polyuretaani.....	23
<b>4</b>	<b>Analyysimenetelmät.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Teolliset sovellukset .....</b>	<b>27</b>
	5.1 PlastBug .....	27
	5.2 Carbios .....	29
<b>6</b>	<b>Mahdollisuudet ja haasteet .....</b>	<b>31</b>
	6.1 Ongelmakohdat prosessin kehityksessä .....	32
	6.2 Tulevaisuuden mahdollisuudet ja hyödyt.....	33
<b>7</b>	<b>Johtopäätökset .....</b>	<b>33</b>
	<b>Lähdeluettelo .....</b>	<b>37</b>

## Lyhenneluettelo

AFM	Atomivoimamikroskooppi
BHET	Bis-2-hydroksietyylitereftalaatti
EG	Eteeniglykoli
ESBO	Epoksoitu soijaöljy
FTIR	Infrapuna-absorptio spektrofotometri
HDPE	Korkeatiheyksinen polyeteeni
LCC	Leaf-branch compost cutinase
LDPE	Matalatiheyksinen polyeteeni
MHET	Mono-2-hydroksietyylitereftalaatti
PE	Polyeteeni
PET	Polyteenitereftalaatti
PHA	Polyhydroksialkanoaatti
PP	Polypropeeni
PS	Polystyreeni
PUR	Polyuretaani
PVC	Polyvinyylikloridi
SDS	Natriumlauryylisulfaatti
SEM	Pyyhkäisyelektronimikroskooppi
sp.	Laji, käytetään mikrobisuvun nimen perässä, kun tarkkaa lajia ei tunneta
TGA	Termogravimetrinen analyysi
TPA	Tereftaalihappo

## 1 Johdanto

Muovirooska on yksi maailman suurimmista ympäristöongelmista. Muoveja käytetään lähes kaikkialla ja ne ovat osa kaikkien ihmisten elämää. Vuonna 2019 maailmassa valmistettiin muoveja 368 miljoonaa tonnia (PlasticsEurope 2020). Muovimäärien lisäksi suuri ongelma nykyisessä muovien käytössä on muoviesineen lyhyt käyttöikä. Esimerkiksi muovipussia käytetään parhaimmillaan vain sen matkan ajan, kun ihminen kulkee kaupasta kotiin. Kaatopaikat pursuavat muovia, koska sen kierrätys on vielä melko vähäistä, eikä kaikkien muoviesineiden kierrätys ole nykyisillä kierrätysmenetelmillä mahdollista.

Kaatopaikkojakin ongelmallisempi paikka on kuitenkin meret. Merissä on tonneittain muovirooskaa, isoja muoviesineitä, mikromuoveja ja jopa nanomuoveja. Määrä on huima ja se kasvaa koko ajan. Pelkästään Tyynenmeren muovilautta sisältää arvion mukaan vähintään 79 tuhatta tonnia muovirooskaa, jonka massasta 8 % on mikromuoveja (Lebreton et al. 2018). Merissä lojuvat muovirooskat ovat hengenvaarallisia mereneläville ja siten uhkana merien biodiversiteetille. Ongelman aiheuttaja on muovin hidas hajoaminen. Muovityypistä riippuen muoviesineen täydellinen biologinen hajoaminen voi kestää jopa vuosisatoja. Hajoaminen luonnostaan on hidasta, vaikka kyseessä olisikin vain pieni mikromuovipartikkeli. Esimerkiksi muovipullon hajoaminen meressä voi kestää jopa 450 vuotta (WWF 2019).

Mikro-organismit eli mikrobit ovat yksisoluisia eliöitä. Mikrobeilla on lukuisia merkityksellisiä tehtäviä ihmiskunnan hyödyksi ja niitä esiintyy kaikkialla maailmassa, niin merissä kuin maallakin. Mikrobeihin kuuluvat hiivat, virukset, bakteerit sekä monet muut pieneliöt. Mikrobit tunnetaan hyvin hajottajina, koska monet mikrobit hajottavat kuollutta eloperäistä ainesta takaisin luontoon muiden eliöiden käytettäväksi. Mikrobien hyödyntämisestä muovien hajottamiseen on tehty paljon tutkimustyötä, koska muovien hajoamista nopeuttavat tekijät ovat suuressa tarpeessa.

Perinteisten muovin kierrätysmenetelmien rinnalle on tulevaisuudessa nousemassa biotekninen kierrätys, jonka avulla muovien hajottamista voidaan nopeuttaa hyödyntämällä mikrobeja sekä niiden erittämiä entsyymejä. Eri mikrobit ovat kykeneväisiä hajottamaan eri muovilaatuja ja siksi prosessin kehittäminen on hidasta. Jokaiselle muovilaadulle tulisi löytää oma toimiva mikrobi, jonka toiminta täytyy kehittää mahdollisimman aktiiviseksi, jotta hajottaminen olisi

kannattavaa (Koivuranta 2019). Tällä hetkellä yritykset, kuten VTT ja Carbios, pyrkivät kehittämään bioteknisen ratkaisun muovien kierrättämiseksi. Muovien hajoamiseen vaikuttaa kuitenkin moni asia sekä kemiallisista että fysikaalisista ominaisuuksista. Hyödyllisiä ominaisuuksia hajoamisen kannalta polymeerille ovat alhainen molekyylipaino, sulamislämpötila ja kiteisyys. Lisäksi hajoamiseen vaikuttavia tekijöitä ovat molekyylin hydrofobisuus tai -fiilisyys, pinta-ala sekä itse polymeerin rakenne eli sen sisältämät funktionaaliset ryhmät ja haaroittuneisuus. (Toikiwa et al. 2009.)

Tämän työn tarkoituksena on tutkia, miten mikrobit ja niiden entsyymit pystyvät vaikuttamaan erityisesti muuten biohajoamattoman muovin hajoamiseen. Työssä käsitellään mekanismit, miten hajoamisreaktiot tapahtuvat ja mitkä asiat hajoavuuteen vaikuttavat. Lisäksi työssä tarkastellaan käytetyimpien biohajoamattomien muovien kykyä hajota ja nimetään joitakin hajottamiseen osallistuvia mikrobeja sekä näiden entsyymejä. Muovilaadut, joihin tässä työssä perehdytään ovat polyeteeni, polyeteenitereftalaatti, polyvinyylidikloridi, polypropeeni, polystyreeni ja polyuretaani. Näiden lisäksi tutkitaan mahdollisuutta toteuttaa mikrobien avulla tapahtuvaa hajoamista teollisen mittakaavan prosessissa.

## **2 Reaktiomekanismi**

Muovit koostuvat pitkistä polymeeriketjuista sekä lisäaineista. Mikrobit voivat vaikuttaa tämän polymeeriketjun kestävyys eri tavoin hajottamalla sen rakennetta. Hajoaminen ja sen nopeus riippuvat itse mikrobista sekä käsiteltävästä muovilaadusta. (Ghosh et al. 2013.) Hajoamisen seurauksena voi käytetystä mikrobista riippuen syntyä monia erilaisia tuotteita, kuten polttoaineita ja kemikaaleja (Koivuranta 2019). Tässä luvussa esitetään perusmekanismi, kuinka polymeeri hajoaa mikrobikäsittelyssä. Yleisesti muovipolymeerin täydelliseen hajoamiseen liittyy karkeasti kolme eri vaihetta. Vaiheet ovat biohajoaminen, assimilatio ja mineralisaatio.

## 2.1 Biohajoaminen

Biohajoaminen terminä käsittää sekä mikrobin vaikutuksesta alkavan hajoamisen sekä entsyymien avulla tapahtuvan biofragmentaation. Muovin hajoaminen voi tapahtua ainoastaan abioottisen vaikutuksen tai mikrobin avulla, mutta kaikista tehokkaimmin hajoaminen tapahtuu näiden tekijöiden yhteisvaikutuksesta. Abioottinen menetelmä, kuten UV-säteily tai korkea lämpötila, parantavat muovin hajoamista, sillä käsittely saa aikaan hiiliketjun alustavan pilkkoutumisen ja pinnan hajoamisen. Abioottisen menetelmän avulla tapahtuvan hajoamisen seurauksena polymeeri katkeaa pienemmiksi osiksi, ei kuitenkaan vielä monomeereksi. Mikrobit pystyvät hajottamaan paremmin molekyyli­painoltaan pieniä yhdisteitä. Siksi hajoaminen mikrobin avulla tapahtuu nopeammin, kun muovipolymeeri on abioottisen tekijän vaikutuksesta hajonnut pienempiin ketjuihin. Biohajoamattomat suuren molekyyli­painon polymeerit ovat lähes mahdotonta hajottaa mikrobin avulla. (Roy et al. 2008.)

Mikrobin avulla tapahtuva hajoaminen alkaa biofilmin muodostumisella muovin pinnalle. Biofilmi muodostuu mikrobeista, jotka ovat kiinnittyneenä muovin pintaan. Mikrobeja voi olla biofilmillä useita erityyppisiä, eli filmi voi pitää sisällään bakteereja ja sieniä sekä näiden eri lajeja. Tätä kutsutaan mikrobikonsortiksi. Konsortio saa yleisesti aikaan paremman hajottamistuloksen kuin tietty mikrobilaji yksinään. (Flemming 1998.) Tutkimuksissa pyritään kuitenkin usein tutkimaan vain yhden lajin mahdollisuuksia muovin hajottamiseen, jolloin biofilmi koostuu vain tästä tietyistä lajeista, jota tutkitaan. Abioottisen tekijän sekä mikrobin yhteisvaikutuksesta tapahtuva hajoaminen vaikuttaa eniten muovin pinnalla tapahtuviin muutoksiin. Tämä vaikuttavaa polymeerin kemiallisiin sekä fysikaalisiin ominaisuuksiin ja helpottaa biofragmentaation tapahtumista. (Jaiswal et al. 2020.)

Biofragmentaatio on vaihe, jossa polymeeri pilkkoutuu sen mono-, di- ja oligomeereiksi. Hajoaminen voi tapahtua mikrobin erittämien entsyymien tai vapaiden radikaalien avulla. (Lucas et al. 2008.) Osa entsyymeistä kykenee nopeuttamaan polymeeriketjun biologista heikentymistä ja sitä kautta vaikuttamaan sen hajoamiseen. Tämä tarkoittaa, että mikrobin entsyymi pystyy toimimaan katalyyttinä polymeerin hajoamiselle. (Ghosh et al. 2013.) Biofragmentaatio voi tapahtua eri tavoin, riippuen hajottavasta mikrobista ja muovilaadusta. Tapoja, miten reaktio voi tapahtua ovat entsyymaattinen hydrolyysi, entsyymaattinen hapetus sekä radikaalihaketus.



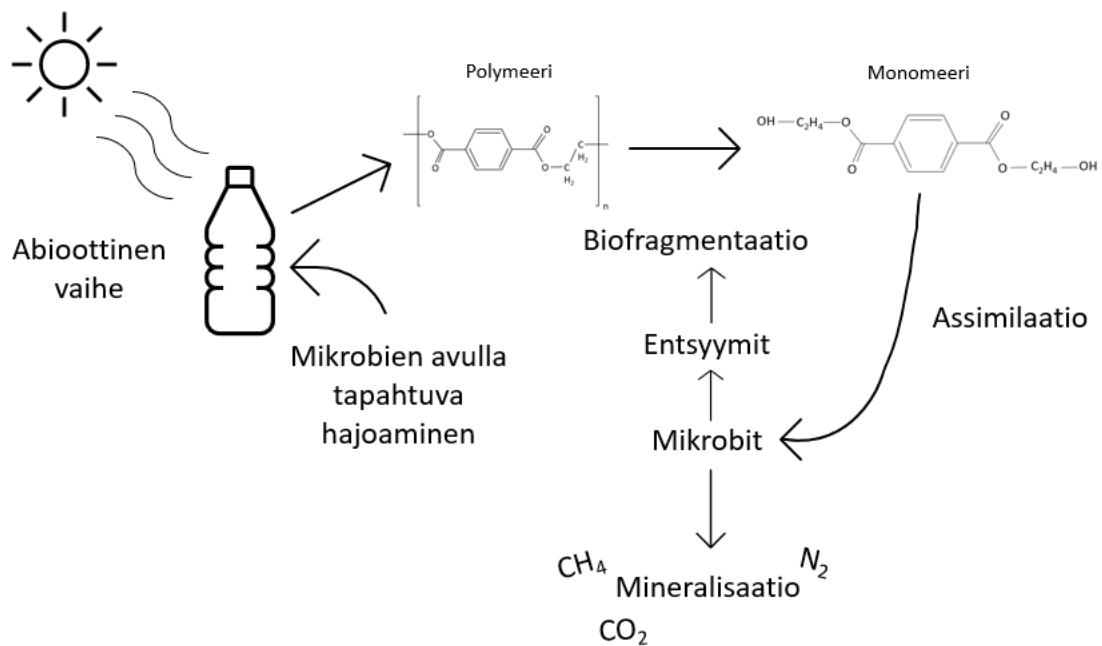
Entsyaattinen hydrolyysi voi tapahtua oksidoreduktaasien tai hydrolaasientsyymien, kuten kutinaasien, avulla (Lucas et al. 2008). Esimerkiksi *Ideonella sakaiensis*-bakteerin erittämä entsyymi PETAasi katalysoi PET:n hydrolyyttistä pilkkoutumista (Han et al. 2017). Entsyaattinen hydrolyysi on yleinen alifaattisten polyestereiden, kuten polylaktidien, hajoamisessa. Hajoaminen tapahtuu kaksi vaiheisessa reaktiossa. Ensin entsyymi adsorboituu substraatin pinnalle, joka tässä tapauksessa on polymeeri. Tämä tapahtuu domeenin avulla, joka sitoo entsyymien polymeerin pinnalle. Reaktion toisessa vaiheessa entsyymi hydrolysoi esterisidoksen. (Tokiwa & Calabria 2006.) PLA:t eli polylaktidit ja PET:t sisältävät molemmat kyseisen esterisidoksen, jotta hydrolyysi voi tapahtua. Tällä hetkellä reaktio tapahtuu kuitenkin suurimmaksi osin vain muovin pinnalla ja siksi inkubointiajat, eli mikrobialtistukseen kuluvat ajat, ovat pitkiä (Ebler et al. 2009). Entsyaattisessa hydrolyysissä nähdään ongelmista huolimatta paljon mahdollisuuksia hajottamisen lisäämiseen ja PET:n hajoamisen tutkiminen onkin edennyt pisimmälle kaikista biohajoamattomista muovilaaduista.

Polymeerin hiili-vetyketjuun voi olla kiinnittyneenä myös funktionaalisia ryhmiä, kuten typpeä, happea tai rikkiä. Nämä funktionaaliset ryhmät aiheuttavat polymeeriketjuun heikon kohdan. Tämän heikomman kohdan kautta mikrobit pystyvät vaikuttamaan hajoamiseen tehokkaammin kuin pelkkään hiiliketjuun, koska funktionaalisen ryhmän aiheuttama heikkokohta hajoaa helpommin. (Ghosh et al. 2013.) Kaikki polymeerit eivät kuitenkaan sisällä funktionaalista ryhmää, joka aiheuttaisi rakenteeseen alttiimman kohdan mikrobihyökkäykselle. Tällainen on esimerkiksi polyeteeni. Tähän vankkaan rakenteeseen voidaan puuttua entsyaattisella hapetuksella. Reaktio voi tapahtua oksidoreduktaasi-, peroksidaasi- tai oksidaasientsyymien avulla. Kaikissa tapauksissa mikrobi pystyy hapettamaan polymeerin. (Lucas et al. 2008.) Oksidoreduktaasientsyymi sisältää yhden tai kaksi happiatomia. Se kykenee lisäämään polymeerin hiiliketjuun happiatomin, joka aiheuttaa paikallisen sähkövarauksen eli heikomman kohdan. Entsyymi on kuitenkin hyvin harvinainen, koska se helposti tuhoaa myös kantajamikrobinsa rakenteen. (Ghosh et al. 2013.) Usein hapen lisääminen saa aikaan joko alkoholi- tai peroksyyliryhmän syntymisen. Osa entsyaattisista hapetusreaktioista synnyttää myös vapaita radikaaleja, jotka pystyvät nopeuttamaan entisestään polymeerin hajoamista. Tällaista radikaalien vaikutuksesta tapahtuvaa reaktiota kutsutaan radikaaliseksi hapetuksi. (Lucas et al. 2008.)

Täydellisessä hajoamisessa polymeeri pilkkoutuu takaisin rakennepalikoihinsa eli monomeereiksi, joita polymeeriketjussa voi olla jopa kymmeniätuhansia. Biohajoamisvaiheessa tapahtuvaa reaktiota, jossa polymeeri hajoaa monomeereiksi kutsutaan depolymeroinniksi. Depolymerointiprosessissa syntyvistä monomeereista voidaan myöhemmin syntetisoida uusia polymeerejä (Kamimura et al. 2011). Aiheesta tehdyissä tutkimuksissa koeolosuhteet pyritään pitämään sellaisina, että polymeeri on ainoa mahdollinen hiilen lähde mikrobille, jolloin mikrobit pyrkivät hyödyntämään sitä mahdollisimman tehokkaasti ja muodostamaan täten biofilmin muovin pinnalle. (Ghosh et al. 2013.)

## 2.2 Assimilaatio ja mineralisaatio

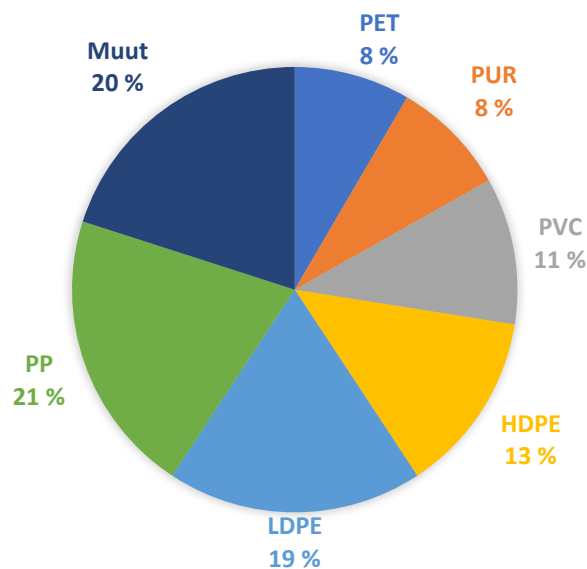
Biofragmentaatioissa syntyneet monomeerit kuljetetaan mikrobin sisään assimilaatiolla. Assimilaatiolla tarkoitetaan syntyneiden yhdisteiden integrointia mikrobiin sen solukalvon läpi. Assimilaatio toimii ikään kuin hajoamisen viimeistelynä. Kaikki aineet eivät kuitenkaan pysty läpäisemään mikrobin solukalvoa. Biotransformaatioreaktiolla pystytään lisäämään yhdisteen liukoisuutta, jotta syntyneet yhdisteet voivat läpäistä solukalvon. Solun sisälle päässeet yhdisteet hapetetaan, jotta mikrobit pystyvät hyödyntämään ne energian- ja hiilen lähteenään. Energian tuottaminen mikrobissa vaatii aerobisen hengityksen, anaerobisen hengityksen tai fermentaatio-reaktion, jotta energia pystytään hyödyntämään mikrobin käyttöön. Assimilaation tapahtumista voidaan tutkia syntyneiden metaboliittien määrällä. Metaboliitit ovat mikrobin aineenvaihdunnassa syntyneitä tuotteita, joista osa erittyy takaisin mikrobisolun ulkopuolelle. Tällaisia ovat esimerkiksi orgaaniset hapot ja aldehydit. Sisään jääneet metaboliitit hapetetaan, jolloin tuotteina muodostuu hiilidioksidia, vettä, typpeä tai metaania sekä mahdollisesti muita epäorgaanisia molekyylejä. Tätä vaihetta kutsutaan mineralisaatioksi. (Lucas et al. 2008.) Kuvassa 1 on havainnollistettu koko hajoamisen peruserä.



Kuva 1 Muovien hajoamisen peruseriaate mikrobien avulla.

### 3 Muovilaadut

Tässä luvussa perehdytään käytetyimpiin muovilaatuihin ja niitä hajottaviin mikrobeihin. Muovit voidaan jakaa biohajoaviin ja biohajoamattomiin muoveihin. Biohajoava muovi ei tarkoita sitä, että ne olisivat biopohjaisia, sillä biohajoavia muoveja on niin uusiutumattomista kuin uusiutuvista lähteistä valmistettuja muoveja. Tunnettuja biohajoavia muoveja ovat esimerkiksi polylaktidit (PLA) ja polyhydroksialkanoaatit (PHA), joita molempia käytetään muun muassa pakkauksissa. Biohajoavat muovit hajoavat mikrobien vaikutuksesta ympäristössä vedeksi, hiilidioksidiksi ja biomassaksi, sekä esimerkiksi PHA:n tapauksessa metaaniksi. (Jiang & Zhang 2013.) Biohajoamattomat muovit ovat biohajoaviin muoveihin verrattuna hyvin hitaita hajoamaan pelkkien ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Tässä luvussa perehdytään käytetyimpiin biohajoamattomiin muoveihin ja niiden hajoamiseen mikrobien avulla. Kuvassa 2 on esitetty Euroopan käytetyimmät muovityypit vuonna 2019 sekä niiden prosentuaalinen kysyntä.



Kuva 2 Muovityyppien kysyntä Euroopassa prosentuaalisesti vuonna 2019 (Diagrammin tiedot: PlasticsEurope 2020).

### 3.1 Polyeteeni

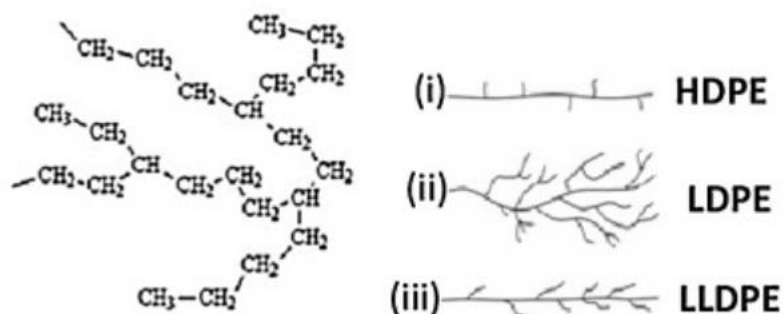
Polyeteeni (PE) on maailman käytetyin muovityyppi ja sen kysyntä Euroopassa kattaa yli neljäsosan kaikista muovilaaduista (PlasticsEurope 2020). Polyeteenin hajottamisen tekee vaikeaksi sen suuri molekyylipaino. Pienemmissä polyeteenin osissa, kuten polyeteenioligomeereissä, molekyylipaino ei ole kovin suuri, jolloin hajoaminen mikrobien avulla on mahdollista. (Ghosh et al. 2013.) Polyeteenin hajottamiseen kolme tehokkainta bakteerisukua ovat *Bacillus*, *Lysinobacillus* ja *Streptomyces* (Shahnawaz et al. 2016). Sukujen bakteerit, joiden todettiin olevan potentiaalisia hajottamaan polyeteeniä, on esitetty taulukossa I.

Taulukko I Polyeteeniä parhaiten hajottavat mikrobit ja niiden lajit (Shahnawaz et al. 2016).

<b>Suku:</b>	<b>Laji:</b>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cerus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquifaciens</i> <i>B. methylotrophicus</i>
<i>Lysinobacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>S. longisporoflavus</i>

Yksi suurimmista ongelmista polyeteenin hajoamiselle on sen hydrofobisuus. Useimpien bakteerien pinnat ovat hydrofiilisiä, jolloin bakteerin on vaikeampi tarttua muovin pintaan hylkimisefektin vuoksi. (Orr et al. 2004.) Abioottisessa vaiheessa polyeteenin altistaminen UV-säteilylle muodostaa karbonyyliryhmiä polymeerin hajotessa. Hajoaminen lisää polymeerin hydrofiilisyyttä, jolloin hydrofiilinen bakteeri pystyy kiinnittymään polymeerin pinnalle helpommin ja muodostamaan biofilmin. (Gumargalieva et al. 2000.) Molekyylipainon ja hydrofobisuuden lisäksi polyteeniltä puuttuu funktionaaliset ryhmät, jotka tekisivät siitä alttiin mikrobien hyökkäyksille (Roy et al. 2008).

Polyeteeni voidaan jakaa eri luokkiin sen tiheyden perusteella: matalatiheyksisiin polyeteeneihin (LDPE) ja korkeatiheyksisiin polyeteeneihin (HDPE). Vaikka näistä molemmat ovat tyypiltään polyeteeniä, niiden rakenteen haaroittuvuus on keskenään erilainen. LDPE:n ja HDPE:n hajoamista on tutkittu erikseen, niiden erilaisten luonteiden vuoksi. Kuvassa 3 on esitetty LDPE:n ja HDPE:n rakenteiden eroavaisuudet.

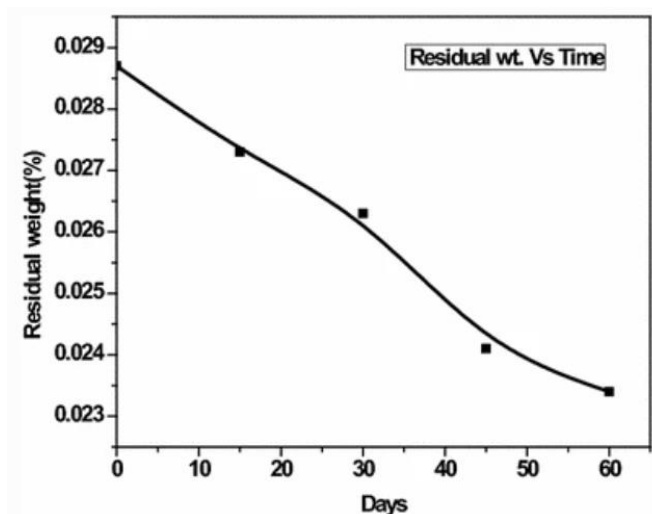


Kuva 3 Kuvassa vasemmalla LDPE:n molekyylirakenne. Oikealla näkyy, että HDPE:n rakenne on selvästi lineaarisempi kuin runsaasti haaroittuneella LDPE:lla. (Kumar Sen & Raut 2015.)

### 3.1.1 Korkeatiheyksinen polyeteeni

Korkeatiheyksinen polyeteeni on yleisesti vahvempi versio polyeteenistä. Sitä käytetään esimerkiksi roskasäiliöissä ja pesuainepulloissa, jotka vaativat materiaalilta enemmän kestävyyttä ja kovuutta. Se on rakenteeltaan vain vähän haarautunut hiili-vetyketju, jonka vuoksi sillä on suuremmat molekyylien väliset voimat kuin LDPE:llä. Tämän vuoksi se on kestävämpi fyysisiltä ominaisuuksiltaan. Bakteerisuvut *Arthrobacter* ja *Pseudomonas* pystyvät yleisesti käyttämään HDPE:ä hiilen lähteenään. Molemmat bakteerit ovat meressä eläviä, jonka vuoksi ne voisivat olla suuri apu merien mikromuovien hajoamiseen. 30 päivän kokeen aikana HDPE:n massa putosi *Arthrobacter* sp. bakteerien avulla 12,2 % ja *Pseudomonas* sp. avulla 15,18 %. (Balasubramanian et al. 2010.)

Awasthin et al. tutkimuksen mukaan *Klebsiella pneumoniae*-bakteeri olisi kaikkein tehokkain tunnettu bakteeri hajottamaan korkeatiheyksistä polyeteeniä. Se kykeni hajottamaan HDPE:a 18,4 % 60 päivän koejakson aikana. (Awasthi et al. 2017.) Kuten kuvasta 4 nähdään, HDPE:n massa laskee ajan kuluessa tasaisesti. Karkea arvio HDPE:n hajoamisesta 30 päivän jälkeen on vain 9 %, joka on vähemmän kuin Balasubramanian et al. tutkimuksen bakteereilla. Tämän perusteella *Pseudomonas* sp. olisi siis selvästi tehokkaampi bakteeri hajottamaan korkeatiheyksistä polyeteeniä. *Pseudomonas*-bakteerisuku on osoittautunut tehokkaaksi myös monien muuten biohajoamattomien muovien hajottamiseen.



Kuva 4 *Klebsiella pneumoniae*-bakteerin vaikutus korkeatiheyksisen polyeteenin hajoamiseen (Awasthi et al. 2017).

### 3.1.2 Matalatiheyksinen polyeteeni

Matalatiheyksinen polyeteeni (LDPE) on rakenteeltaan selvästi haarautuneempi kuin korkeatiheyksien polyeteeni. LDPE:n suurimpia käyttökohteita ovat muovipussit, mutta sitä käytetään myös muissa ohuissa kalvoissa. *Bacillus*-suvusta on tunnistettu 3 bakteeria, jotka voivat hajottaa LDPE-muovia, kun se on ensin altistettu UV-säteilylle ja hajoaminen on näin alkanut. Nämä bakteerit ovat *Bacillus circulans*, *Bacillus brevis* ja *Bacillus sphaericus*. (Watanabe et al. 2009.) *Bacillus*-bakteerisuvun on todettu hajottavan LDPE:a myös muissa tutkimuksissa. Sudhakar et al. tutkimuksessa todetaan *Bacillus sphaericusen* lisäksi myös *Bacillus cereus*-bakteerin hajottavan LDPE-muovia. Hajoaminen on selvästi nopeimmillaan, kun muovi on lämpökäsitelty ennen sen altistamista bakteereille. Samat bakteerit sopivat myös HDPE:n hajottamiseen, mutta LDPE:n hajoaminen on selvästi nopeampaa, koska HDPE:n polymeeriketjut ovat tiukemmin pakkautuneet. Lisäksi pienen mineraaliöljyn määrän lisääminen paransi tutkimustuloksia noin 50 % 4 viikon inkubointijakson aikana. Mineraaliöljyn vaikutus liittyy hydrofobisiin vuorovaikutuksiin polyeteenin pinnalla, jonka vuoksi se estää muovia ja bakteereita hylkimästä toisiaan. Tällöin biofilmi muodostuu todennäköisemmin. (Sudhakar et al. 2008.)

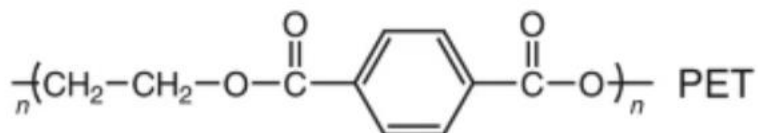
Polyeteenin hajoaminen alkaa kaikissa tapauksissa abiottisella vaiheella, jossa altistetaan polymeeri esimerkiksi säteilylle. Polyeteenin hajottamisessa tätä vaihetta on mahdollista tehostaa

kobolttistearaatin avulla, jolloin abiottinen hajoaminen tapahtuu nopeammin. Tämän jälkeen mikrobit pystyvät hyödyntämään hajonnutta muovia vielä tehokkaammin. Lisäksi abiottisen vaiheen aikana tapahtui funktionalisoitumista, enimmäkseen hapettumista, joka tehostaa myös osaltaan seuraavissa vaiheissa tapahtuvaa hajoamista. Käsittelyn jälkeen bakteerit tunnistavat pienemmän molekyylipainon omaavat hapetetut yhdisteet ja pystyvät hyödyntämään niitä energian ja hiilenlähteenä. (Roy et al. 2008.)

### 3.2 Polyeteenitereftalaatti

Polyeteenitereftalaatti eli PET-muovi on hyvin yleinen materiaali pakkaus- ja tekstiiliteollisuudessa. Pakkauksissa tunnettu PET:n käyttökohde on muovipullot ja tekstiiliteollisuudessa fleece-kangas. Tällaiset kankaat irrottavat mikromuovia pesun aikana jätevesiin, josta partikkelien kerääminen on haastavaa. Pesun aikana fleecakangas irrottaa mikromuovia jopa 0,016 % ja kuivauksessa 0,027 % alkuperäisestä massastaan. (Pirc et al. 2016.)

PET on muovityypeistä helpoin hajotettava, koska sen reaktiomekanismi ja hajottavat mikrobit tunnetaan hyvin. Kuvassa 5 on esitetty PET:n rakenne. Polyeteenitereftalaatti muodostuu eteeniglykolin (EG) ja tereftaalihapon (TPA) välissä dehydraatioreaktiossa, joka saa aikaan esterisidoksen syntymisen. (Han et al. 2017.)

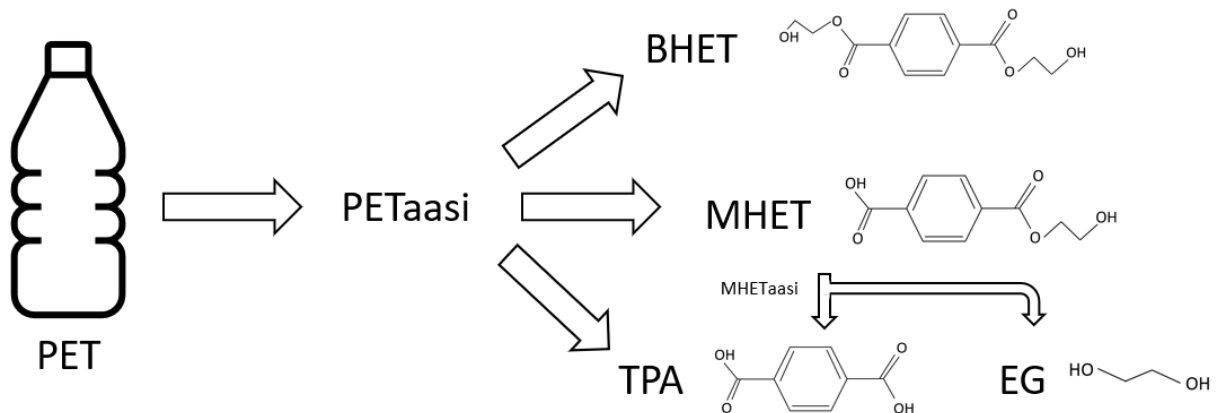


Kuva 5 Polyeteenitereftalaatin rakenne (Han et al. 2017).

PET on muovityypeistä tutkituin mikrobiselle hajoamiselle, jonka vuoksi sen hajoaminen ja siihen liittyvät tuotteet tunnetaan parhaiten. Erityisesti bakteeri nimeltä *Ideonella sakaiensis* 201-



F6 on noussut esiin puhuttaessa PET:n hajoamisesta. Se pystyy hyödyntämään PET-muovia energian- ja hiilen lähteenään erittäin tehokkaasti. Bakteerin todettiin hajottaneen PET-kalvo lähes kokonaan 6 viikon inkubointijakson perusteella. (Yoshida et al. 2016.) Kyseinen bakteeri toimii erittämällä PETAasi entsyymiä. PETAasi toimii katalyyttinä hydrolyyttiselle pilkkoutumiselle, jossa PET pilkkoutuu Bis-2-hydroksietyylitereftalaatiksi (BHET), mono-2-hydroksietyylitereftalaatiksi (MHET) ja TPA:ksi. MHET pilkkoutuu vielä MHETAasi entsyymin avulla PET:n monomeereiksi eli TPA:ksi ja EG:ksi. Myös MHETAasi on PETAasin tavoin *Ideonella sakaiensis*-bakteerin erittämä entsyymi, joten hajoaminen TPA:ksi ja EG:ksi voi tapahtua pelkästään tämän bakteerin voimin. (Han et al. 2017.) Kuvassa 6 on esitetty PET:n hajoamisen periaate PETAasin ja MHETAasin avulla. PETAasi katalysoi parhaiten MHET:n hydrolyysiä, jonka vuoksi MHETAasin katalysoima reaktio on myös erittäin tärkeä ja yleinen reaktio. PETAasin kyky hajottaa PET-muovia suoraan TPA:ksi on hyvin rajallinen ja hajotus onnistuu vain pienille määrille muovia kerrallaan. Siksi hajoaminen monomeereiksi tapahtuu pääasiassa MHET-välvaiheen kautta. (Yoshida et al. 2016.)



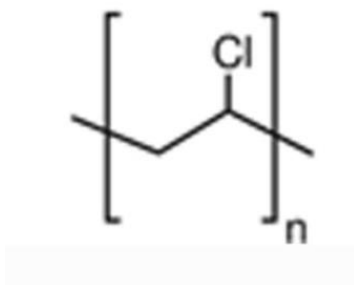
Kuva 6 Polyeteenitereftalaatin hajoaminen PETAasi- ja MHETAasientsyymien avulla (Mukautettu: Austin et al. 2018).

PET:n hydrolyysi onnistuu paremmin amorfisella pinnalla kuin kiteisellä. Kiteisellä pinnalla PET-kalvolle ei muodostunut kunnollista biofilmiä, joka kertoo, ettei kiteinen pinta tue bakteerin kasvua. Massan muutosta ei tapahtunut 14 päivän inkuboinnin aikana, vaikka tiedetään PET:n hajoavan *Ideonella sakaiensis*-bakteerin ja sen entsyymien avulla lähes kokonaan. Kiteinen PET on kuitenkin mahdollista muuttaa amorfiseksi, kun se ensin sulatetaan, jonka jälkeen jäädytetään nopeasti. Esimerkiksi muovipulloissa suurin osa pullon massasta on kiteistä materiaalia, jonka vuoksi ne täytyisi käsitellä amorfisiksi ennen hajottamista. (Wallace et al. 2020.)

Tournierin et al. tutkimuksen mukaan on vielä tunnettua PETAasiakin aktiivisempi entsyymi hajottamaan PET:a. LCC-kutinaasin (leaf-branch compost cutinase) on todettu olevan tehokkain entsyymi katalysoimaan PET:n entsyymattista hydrolyysia. Kyseisen entsyymin toimintaa on saatu parannettua niin, että 10 tunnin jälkeen PET:a on hajonnut 90 %. (Tournier et al. 2020.) Entsyymien toiminta PET:n hajottamisessa on selvästi tehokkain verrattuna minkä tahansa muun muovin hajoamiseen. Kyseisen entsyymin toiminta on osa Carbiosin tutkimusta mikrobien käyttöön erityisesti PET:n hajottamisessa. Tutkimuksesta on kerrottu lisää luvussa 5.2.

### 3.3 Polyvinyylidikloridi

Tunnetun PVC:n eli polyvinyylidikloridin käyttömahdollisuudet ovat äärettömät. Sen suosio johtuu polymeerin kestävydestä ja kustannustehokkuudesta. Sitä käytetään niin pakkausmateriaalina kuin erilaisissa rakennustarpeissa. (Patrick 2005.) PVC:n hävittäminen kotona on ympäristöriski sen sisältämän klooriatomin vuoksi. Klooria sisältävän yhdisteen polttaminen tuottaa kloorikaasua sekä fosgeenia, jotka ovat myrkyllisiä kaasuja ja siksi PVC ei sovi poltettavaksi ilman asianmukaista suodatusta. (WHO & ILO 2017.) PVC:n hajoamisesta on vähemmän onnistuneita tutkimuksia kuin muista laajalti käytetyistä muovityypeistä, koska sen hajottaminen on vaikeaa. Syitä miksi PVC on hyvin inertti biologiselle hajoamiselle ovat sen hydrofobinen luonne sekä korkea molekyylipaino, joka johtuu polymeerin suuresta koosta. (Vivi et al. 2019.) Kuvassa 7 on esitetty PVC:n rakenne.



Kuva 7 PVC:n rakenne (Urbanek et al. 2018).

Yksi mahdollisista PVC:n hajottajista on *Chaetomium globosum*-sieni. Kyseinen sieni kykeni tarttumaan ja kasvattamaan biofilmin muovin pinnalle, joka tarkoittaa sen jonkinlaista mahdollisuutta hajottaa ja käyttää polymeeriä energianlähteenään. Massan muutokseksi tutkimuksessa saatiin 9 % alkuperäisen PVC-kalvon massasta. PVC:n hajoaminen onnistuisi paremmin, jos inkubaatioaikaa pidennettäisiin, koska tutkimuksessa kokeeseen käytetty aika oli vain 28 päivää. (Vivi et al. 2019.)

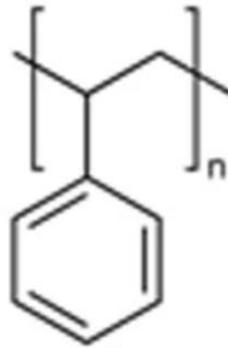
*P. citronellolis* ja *B. flexus* bakteerit näyttivät pystyvän hajottamaan PVC:a, koska ne pystyivät muodostamaan biofilmin muovin pinnalle. Käytetty PVC-kalvo sisälsi kuitenkin 30 % painostaan lisäaineita, kuten epoksoitua soijaöljyä (ESBO). Hajoavuuden selvittämiseen käytettiin termogravimetristä analyysia (TGA) ja geelipermeaatiokromatografiaa (GCP). Mikrobialtistuksen aikana PVC:n lämpöstabiilisuus kasvoi TGA mittauksen perusteella. (Giacomucci et al. 2019.) ESBO on luonnostaan biohajoava ja sen läsnäolo polymeerissä laskee muovin lämpöstabiilisuutta. Tämä viittaisi siihen, että lisäaineet polymeerissä hajoavat altistuksen aikana. Bueno-Ferrerin et al. tutkimuksessa on kuitenkin todettu, että lämpöstabiilisuus on hyvin riippuvainen pehmittimien ja lisäaineiden määrästä polymeerissä, joten täyttä varmuutta hajoamisesta on lämpöstabiilisuuden perusteella mahdotonta sanoa. (Bueno-Ferrer et al. 2010.) Toinen tapa selvittää hajoaako polymeeri, on tutkia sen runkoketjun lyhenemistä. Hajoamisen seurauksena polymeerin runko hajoaa pienempiin osiin. GPC-mittauksen avulla voidaan tutkia sen lukukeskimääräisen molekyylipainon ( $M_n$ ) pienenemistä, jota voidaan pitää merkinä hajoamiselle. Tutkimuksen tuloksena todettiin  $M_n$ :n pienentyneen noin 10 %. Giacomuccin et al. tutkimus päättyi siihen lopputulokseen, että pääosin aktiivinen biohajoaminen tapahtui PVC:n sisältämille

lisäaineille, mutta myös pienissä määrin itse polymeerille. Tehokkain bakteeri PVC:n hajottamiseen on *P. citronellolis*, jonka käsittelyn tuloksena polymeerin Mn pieneni 100 %:sta noin 90 %:iin. (Giacomucci et al. 2019.) *P. citronellolis* olisi potentiaalinen vaihtoehto kehittämiseen PVC:n hajottamista varten, koska se todistetusti kykeni hajottamaan myös itse polymeeriä.

Patilin ja Badgen tutkimus on todennut *Micrococcus Lutelus*-bakteerin hajottavan PVC:ä. Hajotuskykyä mitattiin tutkimalla vapautuneen kloorin määrää ja mineralisaatiota. Tapahtuvan mineralisaation mittausta toteutettiin mittaamalla syntyneen hiilidioksidin määrää. Koe osoitti klooria vapautuneen 70 päivän koejakson aikana 0,36 % ja hiilidioksidia syntyneen 8,87 %. (Patil & Badge 2012.) PVC:n hajoaminen ei siis tapahdu nopeasti ja onkin tällä hetkellä yksi vaikeimmista muovityypeistä sen hajoavuuden kannalta. PVC on kestävä muovi, mutta sen muokkaaminen ei onnistu ilman, että se synnyttää myös pienen määrän jätettä, jonka kierrättäminen on mahdotonta. (Patrick 2005.) Tästä syytä olisi tärkeää löytää ratkaisu PVC:n hajottamiseen.

### 3.4 Polystyreeni

Polystyreeni (PS) on kestävä muovi, jota käytetään paljon esimerkiksi teollisuudessa. Sen suosio johtuu muovin kestävydestä ja monipuolisuudesta. Polystyreeni on kuitenkin vaikeasti hävitettävissä sen vahvan polymeeriketjun vuoksi. Jotkin mikrobit voivat kuitenkin käyttää polystyreeniä hiilen lähteenä omalle toiminnalleen. Entsyymit eivät pysty katalysoimaan polystyreenin hajoamista sellaisenaan, koska sen molekyylipaino on niin suuri. (Ho et al. 2018.) Kuvassa 8 on esitetty polystyreenin rakenne.



Kuva 8 Polystyreenin rakenne (Urbanek et al. 2018).

Suurimman massan muutoksen sai aikaan bakteeri *Bacillus subtilis*, joka pystyi hajottamaan noin 59 % polystyreenin alkuperäisestä massasta 4 kuukauden inkubointijakson aikana. Samassa tutkimuksessa huomattiin myös, että *Staphylococcus aureus* (37,5 %) ja *Streptococcus pyogenes* (11,1 %) kykenivät hajottamaan PS-muovia hyvin tuloksin. Kokeessa käytetyt PS-näytteet ovat kuitenkin olleet hyvin pieniä partikkeleita. (Asmita et al. 2015.) Tällöin hajoaminen on yleisesti nopeampaa, koska tarttumapinta-alaa bakteerille on enemmän suhteessa partikkelin kokoon.

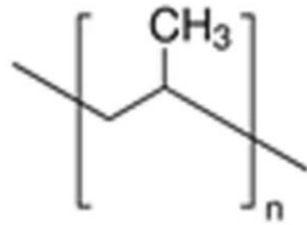
Polystyreeni on myös mahdollista muokata biohajoavaan muotoon. Polystyreenistä saadaan pyrolyysireaktion avulla valmistettua styreeniöljyä. Bakteeri *Pseudomonas putida* pystyy muuttamaan styreeniöljyn polyhydroksialkaonaatiksi (PHA), joka on biohajoava polyesteri. 64 grammaa polystyreeniä pystyttiin tällä menetelmällä muuttamaan 6,4 grammaksi PHA:a. Jotta pyrolyysireaktio toteutuu toivotulla tavalla, se vaatii korkean, vähintään 520 °C, lämpötilan sekä tarpeeksi pitkän inkubaatioajan (1 h/1,5 kg). (Ward et al. 2006.) Pyrolyysissä muodostuu styreenikaasua, joka on myrkyllinen ja karsinogeeninen aine. *Exophiala jeanselmei*-sienen on todistettu pystyvän puhdistamaan ilmaa styreenikaasusta. Yhdistämällä kyseinen sieni reaktioon voitaisiin estää myrkyllisten kaasujen leviäminen. Suuren reaktiolämpötilan vuoksi menetelmää on vaikea hyödyntää teollisen mittakaavan prosesseissa, koska sen energiankulutus olisi huomattavasti suurempi kuin nykyisillä muovien kierrätysmenetelmillä tai esimerkiksi jätteen polttamisella.

Reaktion onnistuminen perustuu olomuodon muutokseen. Kun polystyreeni muutetaan styreeniöljyksi sen fysikaalinen luonne muuttuu. Öljy on pehmeää ja nestemäistä, toisin kuin polystyreeni. Tällöin bakteerit pystyvät tehokkaammin hyödyntämään sitä, koska niiden liikkuminen nesteessä on nopeampaa ja tehokkaampaa. Lisäksi PS:n molekyylipaino laskee muutoksessa osittaisen hajoamisen vuoksi. Alhainen molekyylipaino on ideaalisempi tilanne mikrobien aiheuttamalle hajoamiselle kuin korkea. Siksi hajoaminen ja tässä tapauksessa muuttuminen PHA:ksi nopeutuu. (Savoldelli et al. 2017.)

Bakteerien *Pseudomonas putida* ja *Salmonella* avulla on onnistuttu hajottamaan polystyreeni esimerkiksi bentseeniksi, naftaleeniksi sekä styreeniksi. Toimivuuteen vaikutti myös polymeerin altistus polystyreenin sulamispisteeseen, joka on 240 °C. Nestemäisessä muodossa oleva alhaisempi viskositeetin arvo mahdollisti paremman hajoamisnopeuden. Koska *Salmonella* on luokiteltu patogeenisten ominaisuuksien vuoksi toisen asteen bioturvallisuustasolle, niin turvallisempi vaihtoehto hajottamiseen olisi bakteeri *P. putida*. (Savoldelli et al. 2017.) *Salmonella*-bakteereilla käsitellyt polymeerit eivät todennäköisesti saisi ikinä käyttö lupaa elintarvikemuoveihin.

### 3.5 Polypropeeni

Polypropeenit (PP) käytetään esimerkiksi putkissa ja kalvoissa. Polypropeenin kierrätys nykyisillä menetelmillä on hyvin haastavaa ja siksi suurin osa PP-jätteestä päätyy kaatopaikalle. (Shimpi et al. 2016.) Polypropeeni on toiseksi tuotetuin muovityyppi, mutta sen hajoamisesta mikrobien avulla on hyvin vähän tutkimuksia, koska sen hajottaminen on osoittautunut hankalaksi. Ongelma johtuu polypropeenin suuresta molekyylipainosta, jonka vuoksi se ei läpäise mikrobien solukalvoa (Garcia 2016). Lisäksi polypropeenilla on vankka molekyylirakenne, jonka vuoksi hajottaminen on vaikeaa. Rakenne on esitetty kuvassa 9.



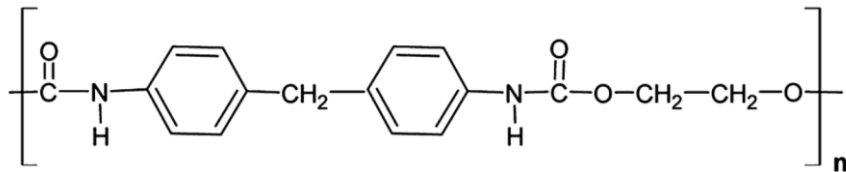
Kuva 9 Polypropeenin rakenne (Urbanek et al. 2018).

Skariyachan et al. tekemän tutkimuksen perusteella bakteerit *Brevibacillus* sp. ja *Aneurinibacillus* sp. sopivat polypropeenin hajottamiseen. Samat bakteerit pystyivät hajottamaan myös LDPE:a sekä HDPE:a. Hajotettavat muovit oli kerätty kaatopaikalta sekä jätevedenpuhdistamoilta. Eri muovityyppejä hajottavien aktiivisten bakteerien löytäminen on tärkeää, jotta mahdollinen prosessi pystyisi hajottamaan erityyppisiä muoveja sekä mahdollisia muovisekoitteita samassa reaktorissa. Polypropeeni toimii näille bakteereille hiilen ja energianlähteenä. Tutkimuksessa käytettiin sekä polypropeeninauhaa, että pellettejä. Tuloksena saatiin, että molempien näytteiden massat olivat laskeneet noin 50 % ja reaktioiden lopputuotteet olivat myrkyttömiä. Vertailunäytteen massa pysyi samana, joka tarkoittaa, että hajoaminen on yksinomaan bakteerien ansiota. Koska tutkimus suoritettiin hyödyntäen kaupallisessa käytössä ollutta muovia se sisältää väistämättä lisäaineita. Todennäköisesti osa massan pienenemisestä johtuu helposti hajovista lisäaineista. (Skariyachan et al. 2018.)

Bakteeri *Stenotrophomonas panacihumi* PA3-2 on kyennyt hajottamaan suuren molekyylipainon polypropeenaa, joka on vastoin yleistä käsitystä mikrobien kyvyttömyydestä hajottaa keinoekoisesti valmistettuja suuren molekyylipainon omaavia polymeerejä. Tutkimuksessa käytetty polypropeeni ei sisältänyt lisäaineita, joiden vuoksi tutkimustulos olisi voinut vääristyä. Bakteeri pystyi 90 päivän aikana hajottamaan korkean molekyylipainon polypropeenaa 12,7 % ja matalan molekyylipainon polypropeenaa 20,3 %. Tämä osoittaa sen, että mitä korkeampi molekyylipaino, niin sitä hitaammin polymeeri hajoaa. Tutkimus osoittaa lisäksi, että mikrobeilla on mahdollisia kykyjä hajottaa myös korkean molekyylipainon polymeerejä hyvin tuloksin, vaikka tämän on ajateltu olevan lähes mahdotonta. (Jeon & Kim 2016.)

### 3.6 Polyuretaani

Polyuretaani (PUR) on synteettinen polymeeri, jota käytetään eristemateriaaleissa, patjoissa ja muissa vaahtomuoveissa sekä maaleissa, että muissa pinnoitteissa. Se luokitellaan kertamuoveihin, joten sen uudelleenkäyttö on hyvin vaikeaa ja siksi ratkaisut sen hajoamiselle ovat erityisen tärkeitä. Polyuretaani on hyvin altis mikrobien aiheuttamalle hajoamiselle, joka aiheutuu sen kemiallisesta koostumuksesta ja molekyylien orientaatiosta. PUR sisältää kemiallisia ryhmiä, kuten typpeä ja happea, jotka aiheuttavat polymeeriin heikomman kohdan, jonka kautta mikrobit sekä entsyymit kykenevät hajottamaan polymeerin rakenteen helpommin. (Howard, Gary T. & Blake 1998.) Kuvassa 10 on esitetty polyuretaanin rakenne.



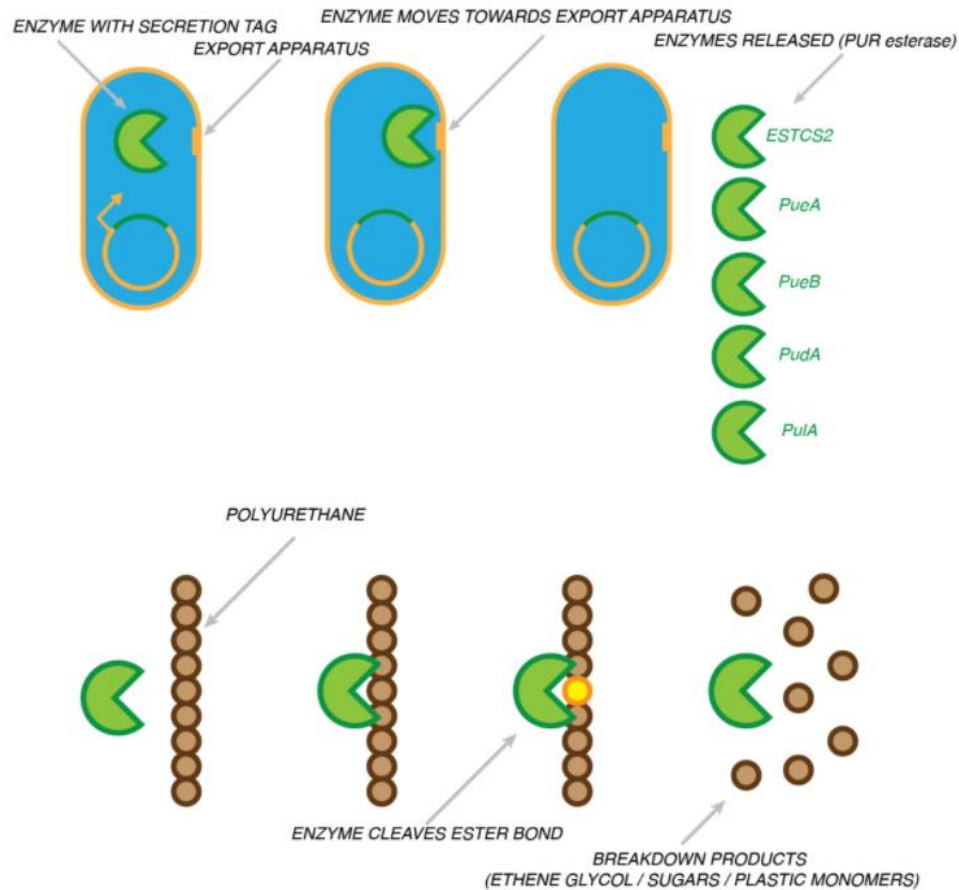
Kuva 10 Polyuretaanin rakenne (Rahman et al. 2019).

Polyuretaanit valmistetaan polyoleista ja isosyanaateista. Riippuen polyolista, synteesissä saadaan joko esterityyppistä tai eetterityyppistä polyuretaania. Esterityyppinen polyuretaani on näistä helpommin hajoava muoto. (Akutsu et al. 1998.)

Tunnettu esterityyppistä PUR:a hajottava entsyymi eli PUR-esteraasi on peräisin *Comamonas acidovorans* TB-35-bakteerista. Reaktio alkaa entsyymillä adsorptiolla PUR:n pinnalle. Tämän jälkeen itse hajoaminen alkaa entsyymillä vaikutuksesta esterisidoksen hydrolyysillä, jolloin hajoamistuotteina syntyy adipiinihappoa ja dietyleeniglykolia. (Akutsu et al. 1998.) Polyuretaanit ovat myös yleisesti alttiita hajoamaan *Pseudomonas*-bakteerisuvun bakteereilla. *Pseudomonas*-bakteerit erittävät hydrolyyttisiä entsyymejä, jotka toimivat hyvinä hajottajina. Esimerkiksi *Pseudomonas protegens* Pf-5 erittämät lipaasit, eli vesiliukoiset entsyymit, PueA ja PueB pystyvät katalysoimaan esterityyppisen polyuretaanin hajoamista. Entsyymit tekevät parhaiten yhteistyötä, jolloin hajoaminen on parhaimmillaan, mutta molemmat pystyvät hajottamaan PUR:a



myös yksinään. (Hung et al. 2016.) Toinen samoja entsyymejä erittävä bakteeri on nimeltään *Pseudomonas chlororaphis* (Howard, G. T. et al. 2007). Kuvassa 11 on esitetty polyuretaanin hajoaminen esimerkiksi entsyymien PueA ja PueB tai PUR-esteraasin avulla.



Kuva 11 Esterityyppisen polyuretaanin hajoaminen entsyymien avulla (Plasticity 2013).

Eetterityyppisen PUR:n hajoamisesta on tehty myös tutkimuksia, vaikka sen hajottaminen ei ole yhtä helppoa. *Alternaria* sp. sienen kanta PURDK2 kykeni hajottamaan eetterityyppistä PUR-vaahtoa 27,5 % 70 päivän aikana. Sienen toiminta perustuu sen erittämiin entsyymeihin, joiden avulla uretaanisidokset katkesivat. (Matsumiya et al. 2010.)

Kaupallista eetteri-PUR-kalvoa (Tecoflex<sup>®</sup>) hajottavia bakteereita ovat *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* sekä hiiva *Yarrowia lipolytica*. Kyseiset mikrobit pystyivät hajottamaan eetterityyppistä PUR:a, mutta hajoaminen tapahtui hitaasti. 5 kuukauden inkubointijakson aikana polyuretaania hajosi vain 2,8–10,5 % riippuen käytetystä mikrobitista. (Stepien et al. 2017.)

#### 4 Analyysimenetelmät

Muovipolymeerin hajoamista voidaan tarkastella monilla erilaisilla analyysimenetelmillä. Mikrobin avulla tapahtuvan hajoamisen seurauksena itse muovin pinta sekä polymeerin rakenne muuttuvat. Yleisiä havaittavia muutoksia ovat pinnan karheutuminen, reikien ja halkeamien muodostuminen, pirstoutuminen, värimuutokset sekä biofilmin muodostuminen muovin pinnalle. (Shah et al. 2008.) Pinnan rakenteen muutoksia sekä biofilmin muodostumista polymeerin pinnalle voidaan tutkia mikroskooppisilla menetelmillä. Suosittuja analyysilaitteita, joita useat tutkimukset ovat hyödyntäneet pinnan muutosten tarkasteluun ovat olleet pyyhkäisyelektronimikroskoopi (SEM) tai atomivoimamikroskoopi (AFM). Lisäksi rakenteellisia muutoksia on mahdollista tutkia FTIR-spektroskoopilla. Spektroskoopin avulla voidaan tutkia funktionaalisia ryhmiä sekä niiden käyttäytymistä mahdollisen hajoamisen aikana. (Suresh et al. 2011.) Esimerkiksi karbonyyliryhmien muodostuminen viittaa abioottisen hajoamisen tapahtumiseen. Pinnan rakenteen muutokset eivät todista itse hajoamisprosessin etenemistä, mutta toimivat ensimmäisenä indikaattorina muovin mikrobisen hajoamisen alkamiselle. (Shah et al. 2008.)

Tärkeä menetelmä polymeerin hajoamisen tarkkailuun on sen massan muuttuminen mikrobialistuksen aikana, jota voidaan tutkia gravimetrisellä analyysillä. Painon laskeminen tapahtuu polymeerin hajoamisen seurauksena. Mikrobin tarttuminen ja lisääntyminen polymeerin pinnalla saa aikaan massan kasvamisen. Nämä painon kasvun aiheuttavat mikrobit täytyy puhdistaa pinnalta tarkasti ennen kokeen jälkeen suoritettavaa punnitusta, jotta tulokset ovat mahdollisimman tarkkoja. (Jaiswal et al. 2020.) Ennen lopullista punnitusta voidaan polymeeri käsitellä SDS:lla (natriumlauryylisulfaatti), joka on pinta-aktiivinen aine eli tensidi. SDS-käsittelyn seurauksena polymeerin pinnalla olevat mikrobit ja epäpuhtaudet liukenevat. Näin voidaan olla varmoja, että massa joka kokeen jälkeen punnitaan, on pelkkää polymeeriä. (Gajendiran et al.

2016.) Hajoamisen aikana tapahtuva massan muutos suoritetaan punnitsemalla puhdistettu näyte ennen mikrobialtistusta sekä SDS-käsittelyn jälkeen, kun polymeeriä on altistettu mikrobeille tietyn ajanjakson ajan. Tämän jälkeen mahdollinen massan muutos  $ML$  voidaan laskea yhtälön (1) mukaisesti (Dang et al. 2018),

$$ML(\%) = \frac{m_b - m_a}{m_b} * 100 \% \quad (1)$$

jossa  $m_b$  näytteen massa ennen hajottamista  
 $m_a$  näytteen massa mikrobialtistuksen ja SDS-käsittelyn jälkeen.

Ongelmallista kuitenkin on, että FTIR-analyysi ja massan muutokset eivät ole kovin tarkkoja menetelmiä, jos tutkimuksessa käytetään kaupallisia muoveja. Massan pieneneminen ja pinnan rakenteelliset muutokset eivät välttämättä viesti itse polymeerin hajoamisesta. Lisäaineet ovat helpommin hajotettavia ja hyödynnettäviä, joten tällaisissa tapauksissa ainakin osa massan muutoksesta on lisäaineiden hajoamista. (Danso et al. 2019.)

Muovin hajoamisnopeutta voidaan tutkia myös mittaamalla hiilidioksidin vapautumista tai hapen kulutusta. Hiilidioksidia syntyy aerobisissa olosuhteissa mikrobien aineenvaihdunnan tuloksena. Hiilidioksidin muodostumista voidaan mitata Sturm-testillä. (Shah et al. 2008.) Sturm-testi on tunnettu mittaustapa aerobisissa olosuhteissa tapahtuvan biohajoamisreaktion seurauksena syntyvän hiilidioksidin mittaukselle (Calil et al. 2006). Hajoamisen aikana myös polymeerin vetolujuus, eli fyysinen kyky vastustaa vetävää voimaa, pienenee. Vetolujuuden muutosta voidaan tutkia ennen kokeen suorittamista ja sen jälkeen tehdyillä testeillä, jossa kappaleeseen kohdistetaan tietty voima ja tuloksia verrataan keskenään. (Suresh et al. 2011.)

## 5 Teolliset sovellukset

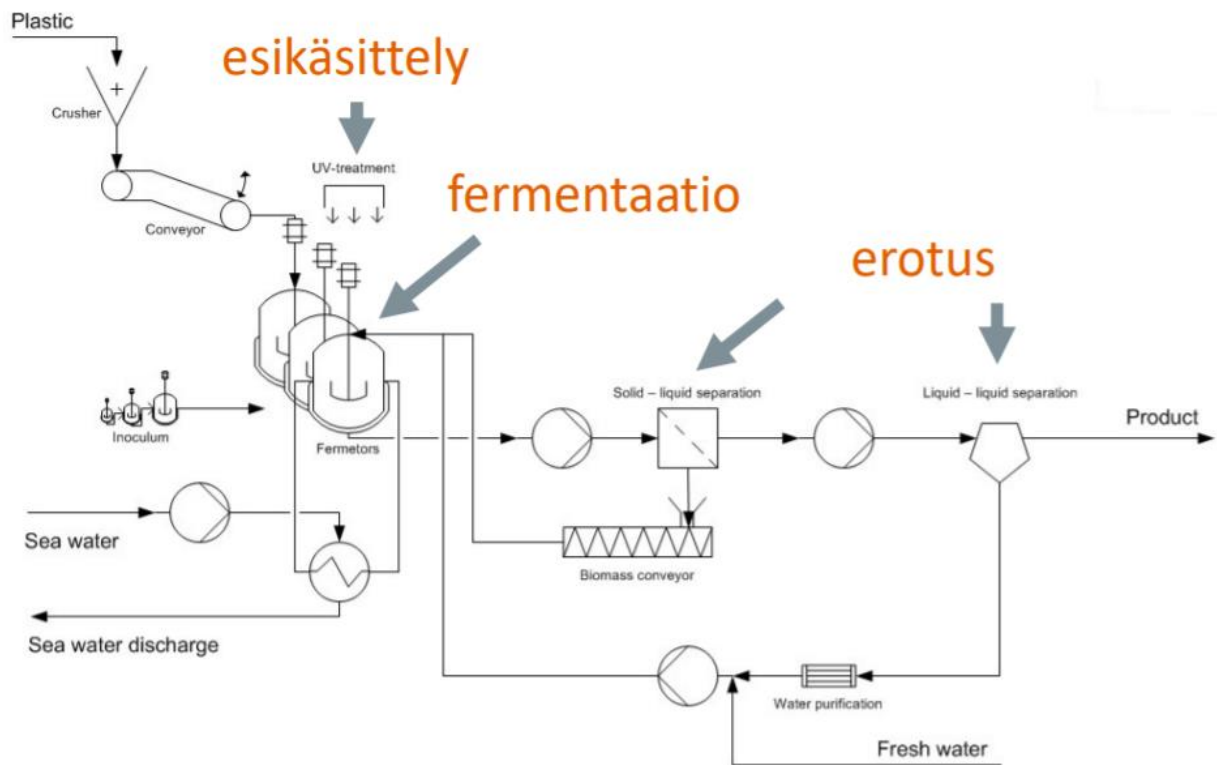
Tällä hetkellä mikrobien avulla muovien hajottaminen ei ole vielä yhdelläkään yrityksellä teollisessa käytössä. Suurimmaksi osaksi tutkimukset keskittyvät vielä laboratoriossa suoritettaviin kokeisiin ja hajottavien mikrobien etsintään. Tässä luvussa tutustaan VTT:n ja Carbiosin projekteihin. Molemmat projektit pyrkivät hajottamaan muovia mikrobien avulla teollisessa mittakaavassa, erilaisin suunnitelmin.

### 5.1 PlastBug

PlastBug on VTT:n projekti, jonka tarkoituksena on hyödyntää mikrobeja ja niiden entsyymejä muovien hajottamiseen. Tarkoituksena on keksiä ratkaisuja kierrättää ja uusiokäyttää syntynyttä muovijätettä. PlastBug-hanke pyrkii löytämään ratkaisuja erityisesti polyeteenin, polypropeenin, polyeteenitereftalaatin sekä polystyreenin hajoamiselle (Immonen 2018).

Peruseriaate prosessille on selkeä. Muovijäte syötetään prosessiin, jonka fermentointireaktorissa mikrobit ja entsyymit hajottavat polymeerit hyödylliseen muotoon. Prosessi on kolmivaiheinen. Siihen kuuluu esikäsitteily esimerkiksi UV-säteilyn avulla, biofermentaatioreaktorissa tapahtuva hajoaminen ja lopullisten tuotteiden erotus. Koko prosessi on tarkoitus saada mahtumaan sekä pieneen tilaan, kuten konttiin, että suureen teolliseen muovinkeräysyksikköön. Tällöin ratkaisu ongelmaan voidaan viedä juuri sinne missä apua tarvitaan, kuten rannikolle, joissa merissä kelluvat muovit ovat suuri ympäristöhaitta. Suuret massat olisi helpompi hajottaa siihen suunnitellussa suuressa yksikössä, esimerkiksi jätteenkäsittelylaitoksen yhteydessä toimivalla laitoksella. Itse prosessin on tarkoitus toimia aurinkoenergialla tai tuulivoimalla, joka tukee sen sijoitussuunnittelua. Prosessiin tarvittavasta vedestä on ainakin osaan prosessivaiheista mahdollista hyödyntää merivettä. Prosessiin syötetään puhdistamatonta muovijätettä, jota on mahdollista hajottaa mikrobien avulla. Jätteen ei tarvitse olla puhdasta, koska mikrobit voivat hyödyntää myös orgaanisen jätemateriaalin ja ne pystyvät tunnistamaan hajotettavan muovilaadun. Tuotteena prosessista voidaan saada useita haluttuja tuotteita, riippuen käytetyistä entsyymeistä ja mikrobeista. Mahdollisia tuotteita ovat esimerkiksi polttoaineet ja kemikaalit. Kuvassa 6 on

esitetty mahdollinen vaihtoehto, mille PlastBug-konsepti voi tulla tulevaisuudessa näyttämään. (Koivuranta 2019.)



Kuva 12 Alustava PlastBug-hankkeen prosessisuunnitelma. Muovijäte esikäsitellään UV-säteilyllä, joka haurastuttaa muovia. Tämän jälkeen fermentointivaiheessa mikrobit ja entsyymit hajottavat muovin ja lopuksi tuotteet erotellaan. (Koivuranta 2019.)

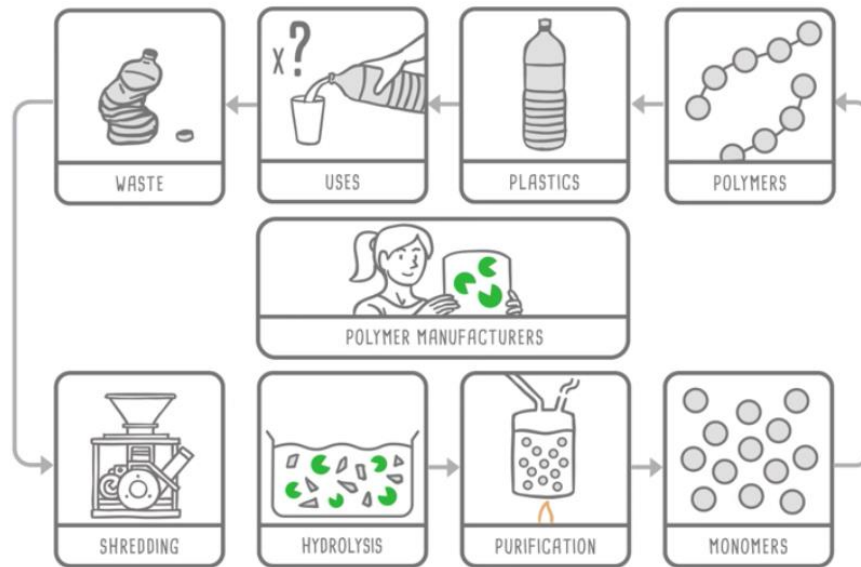
Tällä hetkellä PlastBug projekti pyrkii löytämään aktiivisia mikrobeja. Polystyreenille ja polyeteenille on löydetty hajottavat mikrobit ja tutkimus pyrkii seulomaan mikrobikannoista aktiivisimmat. PET:ille on löydetty muutamia hajottavia mikrobeita, mutta näiden tutkinta jatkuu. Polypropeenille etsitään vielä mahdollisia hajottavia mikrobeja. (Koivuranta 2019.) Mikrobien tutkiminen alkaa mikrobin kiinnittymisen selvittämisellä. Jos mikrobi kiinnittyy muovin pintaan, voidaan sitä pitää mahdollisena hajottajana. Tämän jälkeen tutkitaan mikrobin kykyä hajottaa muovia suolaliuoksessa muutaman kuukauden koejakson aikana. Kun mahdolliset

hajottajat on löydetty, niitä täytyy aktivoida ja muovin hajottamiskykyä nopeuttaa. Muovin hajottamiskyvyn lisäksi tutkitaan, mitä tuotteita hajoamisprosessissa syntyy. (Koivuranta 2018.)

VTT:n mukaan prosessin käyttöönotto voisi olla ajankohtaista vuonna 2030. Prosessi vaatii siis vielä paljon tutkimuksia ja koeajoja. Aluksi prosessi suunnitellaan hajottamaan PS:a ja PET:a, koska niiden kanssa tutkimukset ovat edenneet pisimmälle. Erään arvio mukaan prosessi pystyisi hajottamaan noin 10 tonnia jätettä vuodessa. (Koivuranta 2018.) Maailmassa tuotettiin vuonna 2019 368 miljoonaa tonnia muovia (PlasticsEurope 2020). Maailman muoviongelmaa ei siis muutamalla kontilla lähdetä ratkaisemaan, mutta jokainen pieni parannus on askel oikeaan suuntaan.

## 5.2 Carbios

Carbios on ranskalainen yritys, joka pyrkii kehittämään teollisen mittakaavan prosessia, jossa muovijäte pilkotaan takaisin monomeereiksi entsyymien avulla. Tutkimuksen pääpaino on erityisesti PET-muovin entsyymaattisessa hajottamisessa. (Carbios 2020.) Carbiosin prosessi perustuu muovijätteen jauhamiseen, entsyymaattiseen hydrolyysiin mikrobien avulla sekä monomeerien puhdistukseen ennen uutta polymerointia (Carbios 2016). Kuvassa 13 on esitetty perinteisen PET-muovin käyttökohteen eli muovipullon kierto Carbiosin prosessiin ja sieltä takaisin uudelleen käyttöön.



Kuva 13 Peruseriaate muovipullon kierrosta Carbiosin prosessissa (Carbios 2016).

Perusprosessi muovituotteen kierrätykselle on selkeä, mutta jotta prosessista saadaan mahdollisimman tehokas, se vaatii mikrobien aktiivisuuden parantamista. Desrousseauin et al. patentin mukaan ennen PET:n depolymerointireaktiota on kannattavaa muuttaa muovi amorfiseen muotoon, jolloin polymeeri on helpommin hajoava. Amorfointivaihe pitää sisällään muovituotteen kuumentamisen sen kiteytymislämpötilaan (PET:llä 250–300 °C), jonka jälkeen lämpötila lasketaan sen lasittumislämpötilan alapuolelle (PET:llä 5–65 °C). Reaktio toteutetaan ekstruderissa, jossa myös mikrobien avulla tapahtuva hajottaminen lopulta tapahtuu. Amorfoinnin tarkoituksena on saada rikottua polymeerin kiteinen rakenne. Alhaisen kiteyden polymeeri on helpommin hajotettavissa kuin kiteinen. (Desrousseau et al. 2017.) Tätä seuraa depolymerointireaktio, jossa muovi altistetaan kutinaasientsyymille, joka saa aikaan entsyymattisen hydrolyysin. Lämpötilan olisi tärkeä entsyymien toiminnan kannalta pysyä 20–80 °C välillä. Prosessille on myös suotuisaa tapahtua nesteessä, jolloin sen pH on mahdollista pitää tasaisena, mielellään välillä 4–10. Tällöin entsyymien toiminta on tehokkaimmillaan. (Maille 2019.)

Parhaimman hajottamistuloksen tutkimuksissa antanut entsyymi on kutinaasi LCC, jonka avulla depolymerointireaktiossa on saatu 90 % PET:sta hajoamaan kymmenen tunnin inkuboinnin aikana. Tournierin et al. tutkimuksessa LCC:n tulokset olivat osoittautuneet paremmiksi kuin

PET:n hajottamisesta tunnetun PETAasin. (Tournier et al. 2020.) Toinen mahdollinen tehokas vaihtoehto hajottamiseen LCC:n lisäksi on kutinaasientsyymi, joka on peräisin *Thermobifida cellulosilytica*-bakteerista (Boisart & Maille 2015).

PET:a depolymeroimalla saadaan monomeerejä, kuten tereftaalihappoa. Reaktion jälkeen syntynyt monomeeriseos otetaan talteen puhdistusta varten. Seos on mahdollista puhdistaa tarvittaessa esimerkiksi strippausmenetelmällä. Tämän jälkeen puhtaasta monomeeriseoksesta voidaan syntetisoida uusia polymeerejä. Tereftaalihappo voidaan ottaa depolymeroinnin jälkeen suoraan talteen. (Boisart & Maille 2015.) Syntyneet oligomeerit, joiden pituus yleisesti on 2–20 monomeeriä, voidaan kierrättää takaisin prosessiin (Maille 2019).

Lähitulevaisuuden tavoitteena on menetelmän teollinen käyttöönotto. Vuonna 2021 yrityksen on tarkoitus avata esittelylaitos Ranskaan, jonka jälkeen alkaa mahdollisuuksien mukaan itse prosessin kaupallistaminen (Carbios 2020). Carbiosin kehittämä menetelmä poikkeaa tämänhetkisestä PET-muovin kierrätysmenetelmästä. Uusi menetelmä takaisi 100 % kierrätyksen toisin kuin nykyiset mekaaninen tai kemiallinen PET:n kierrätys. Tällä hetkellä osa kierrätetystä PET-muovista menee väistämättä kierrätyksessä pilalle, eikä päädy uusiokäyttöön. Uudessa menetelmässä reaktio tapahtuu matalassa lämpötilassa ja normaali-ilmanpaineessa, joten sen energiankulutus ei ole suuri. (Carbios 2020.) Menetelmä on lopulta monilta osin parempi kuin muovijätteen polttaminen tai sulattaminen uusiokäyttöä varten. Etuja ja haasteita tarkastellaan laajemmin luvussa 6.2.

## **6 Mahdollisuudet ja haasteet**

Muovien hajottaminen mikrobien avulla on haastava prosessi. Parhaimmillaan se voisi olla mahdollisuus maailman muoviongelmaa vastaan, mutta prosessin kehitys tuo mukanaan ongelmakohtia. Tässä luvussa perehdytään haasteisiin, sekä mahdollisuuksiin, mitä prosessi pitää sisällään ja tuo tullessaan.



## 6.1 Ongelmakohdat prosessin kehityksessä

Kaupallisesti käytetyt muovit koostuvat polymeereistä, sekä lisäaineista, jotka tekevät rakenteesta kestävämmän, pehmeämmän tai muotoiltavamman, riippuen siitä mitä kyseiseltä muovilta halutaan. Tämä aiheuttaa kuitenkin ongelmia muovin hajoamisessa. Suurin osa tutkimuksista suoritetaan käyttäen näitä kaupallisia muoveja. Nämä lisäaineet ja muut epäpuhtaudet hajoavat itse polymeeriketjua nopeammin ja helpommin. Tästä syystä osa tuloksista voi olla vääristyneitä. Erityisesti massan muutoksella mitatusta hajoamisprosentista osa voi olla vain näitä lisäaineita, eikä itse polymeeriä.

Tällä hetkellä tunnetut mikrobit sekä niiden entsyymit eivät ole vielä kovin tehokkaita, eikä erittäin aktiivisia entsyymejä suurimmalle osalle muovityypeistä ole vielä löydetty. Lisäksi suuremman mittakaavan hyödyt vaativat mikrobien geenimuuntelua, jotta muovien hajoaminen voitaisiin maksimoida. Mikrobien geenimuuntelussa tulee nopeasti vastaan myös GMO-lainsäädäntö, joka koskee geenimuunneltuja organismeja. Tämä saattaa olla hidaste prosessin kehittämiseksi. Lisäksi lainsäädännöt jätteenkäsittelystä ja elintarvikemateriaalien käytöstä mahdollisesti hidastavat prosessin toimeenpanoa. (Roschier et al. 2020.)

Ongelmia hajotuksessa voi aiheuttaa suurten kappaleiden hajottaminen, joilla on suuri molekyylimassa. Hajottaminen on huomattavasti vaikeampaa kuin pienten polymeerien, koska tarttumapinta-alaa suhteessa kappaleen kokoon on vähemmän. (Danso et al. 2019.) Lisäksi aktiiviset entsyymit ovat tärkeitä, jotta prosessi saadaan suoritettua loppuun asti. Jos prosessi jää kesken, niin se tuottaa ainoastaan lisää mikromuovia (Roschier et al. 2020). Tämä vain pahentaa mikromuoviongelmaa vesistöissä. Siksi on voitava varmistaa, että prosessi suoritetaan aina loppuun asti.

Yksi valtavista ongelmista on prosessin toteuttaminen teollisessa mittakaavassa. Tällä hetkellä suurin osa tutkimuksista on laboratoriomittakaavassa toteutettuja kokeita. Vaikka mikrobi toimisi laboratorioskokeissa, voi olla, ettei sen kyky todellisuudessa riitä hajottamaan valtavia muovimassoja. Suurin osa löydetyistä bakteereista ei myöskään kykene hajottamaan muovikappaletta kokonaan, varsinkaan lyhyessä ajassa. Carbiosin tutkimus on lähimpänä läpimurtoa, mutta se käsittelee ainoastaan PET:n hajoamista. Siksi olisi tärkeä tulevaisuudessa investoida uusien

aktiivisten mikrobien ja entsyymien etsintään, koska itse prosessi on jo tunnettu ja tehty mahdolliseksi.

## 6.2 Tulevaisuuden mahdollisuudet ja hyödyt

Mikrobit kykenevät hajottamaan muovipolymeereistä erilaisia yhdisteitä, kuten polttoaineita ja kemikaaleja. Erityinen hyöty mikrobien avulla hajottamisesta on, ettei jätteen tarvitse olla prosessissa puhdasta. Mikrobit pystyvät polymeerin hajottamisen lisäksi käyttämään hyödyksi orgaaniset yhdisteet, mitä muovin mukana prosessiin kulkeutuu. Lisäksi kaikki muovilaadut voivat olla kierrätyksessä sekaisin, koska mikrobit tunnistavat tyypin, jota pystyvät hajottamaan. Nykyisillä kierrätysmenetelmillä on tärkeää, että muovilaadut eritellään toisistaan, koska usein kierrätys perustuu sulattamiseen ja uudelleen muotoiluun. Tämän lisäksi energian tarve on selvästi alhaisempi bioteknisessä kierrätyksessä. Mikrobiologinen prosessi voi tapahtua noin 70 °C lämpötilassa. Lisäksi lopputuotteen muokattavuus entsyymien valinnalla on valttikortti prosessille. Entsyymien valinnalla voidaan vaikuttaa itse hajoamistuotteeseen. Mikrobeita voidaan myös muokata geenimuuntelun avulla tuottamaan tiettyä hajoamistuotetta. (Koivuranta 2019.)

Yksi lähitulevaisuuden mahdollinen tavoite on tekstiiliteollisuudesta syntyvien muovipäästöjen ratkaiseminen. Pelkästään aktiivisten entsyymien kehittäminen voisi vähentää näitä päästöjä huomasti. Tämä vaatii kuitenkin mikrobeilta kykyä hajottaa ehjää ja kiteistä kuitua. (Danso et al. 2019.) Tulevaisuudessa olisi tärkeää keskittyä muoveihin, joiden kulutus on suuri, mutta joiden hajottaminen on vaikeaa. Käytetyimmät muovit ovat kestävyydeltään vahvoja ja siksi niiden hajottaminen on ongelmallista.

## 7 Johtopäätökset

Tässä työssä etsittiin ratkaisuja muovien hajoamisongelmaan hyödyntämällä mikrobeja sekä niiden erittämiä entsyymeitä. Tutkimuksen kohteena olivat erityisesti biohajoamattomat muovit, joiden hajottamiselle etsitään jatkuvasti uusia innovatiivisia ratkaisuja. Mikrobien avulla muovijätteen hajottaminen on yksi tulevaisuuden mahdollisuuksista, koska jätemäärät maailmassa

näyttävät vain kasvun merkkejä. Muutamilla mikrobeilla on todistetusti kykyjä hajottaa muovipolymeeri täydellisesti monomeereihin, joka tuo toivoa myös muiden muovityyppien hajottamisen suhteen. Menetelmä edistäisi kiertotaloutta merkittävästi vähentämällä jätteen määrää ja samalla pystyttäisiin varmistamaan luonnonvarojen riittävyys myös tuleville sukupolville.

Mikrobeista erityisesti bakteerit, mutta myös muutamat sienilajit ovat kyenneet hajottamaan muuten biohajoamatonta muovia. Erityisesti bakteerisuvut *Pseudomonas* ja *Bacillus*, sekä entsyymit PETAasi ja LCC-kutinaasi ovat osoittaneet merkittävää aktiivisuutta muovien hajottamisessa. *Pseudomonas*-suvun bakteerit kykenevät hajottamaan tehokkaasti HDPE:a, PS:a ja PU:a. *Bacillus*-bakteerit kykenevät puolestaan hajottamaan LDPE:a ja PS:a. Entsyymeistä PETAasi ja LCC ovat tunnettuja PET:n hajottajia. Alla olevassa taulukossa II on esitetty tässä kandidaatin työssä käsitellyt muovilaadut ja niitä hajottavat mikrobit.

Taulukko II Muovityyppejä hajottavat mikrobit tai niiden suvut.

<b>Muovityyppi:</b>	<b>Mikrobi/-suku:</b>	<b>Lähteet:</b>
Polyeteeni (PE)	<i>Bacillus</i> sp. <i>Lysinobacillus</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.	(Shahnawaz et al. 2016)
Korkeatiheyksinen polyeteeni (HDPE)	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Balasubramanian et al. 2010) (Awasthi et al. 2017)
Matalatiheyksinen polyeteeni (LDPE)	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus cereus</i>	(Watanabe et al. 2009) (Sudhakar et al. 2008)
Polyeteenitereftalaatti (PET)	<i>Ideonella sakaiensis</i>	(Yoshida et al. 2016) (Han et al. 2017)
Polyvinyylidikloridi (PVC)	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Micrococcus lutelus</i> <i>Pseudomonas citronellolis</i> <i>Bacillus flexus</i>	(Patil & Badge 2012) (Vivi et al. 2019) (Giacomucci et al. 2019)
Polystyreeni (PS)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	(Asmita et al. 2015) (Ward et al. 2006) (Savoldelli et al. 2017) (Matsumiya et al. 2010)
Polypropeeni (PP)	<i>Brevibacillus</i> sp. <i>Aneurinibacillus</i> sp. <i>Stenotrophomonas panacihumi</i> PA3-2	(Skariyachan et al. 2018) (Jeon & Kim 2016)
Polyuretaani (PU)	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35 <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 <i>Pseudomonas</i> sp.	(Akutsu et al. 1998) (Hung et al. 2016)

Tutkimuksen tuloksena voidaan todeta, että hajottavia mikrobeja tunnetaan jo monia, mutta niiden kyky hajottaa muovia on vielä suhteellisen heikko. Tulevaisuuden haasteena on pyrkiä muokkaamaan näistä löydetyistä mikrobeista aktiivisempia, jotta prosessin laajemmat kokeet voitaisiin jonakin päivänä aloittaa. Lisäksi mahdollisten aktiivisuutta lisäävien aineiden löytäminen voisi toimia ratkaisuna moniin ongelmiin, kuten hydrofobisuuteen.

Kaikille tässä työssä tutkituille muovityypeille löytyy mahdollinen hajoamisreitti mikrobien avulla. Teollisen mittakaavan prosessit, jossa voitaisiin hajottaa eri muovilaatuja nopeasti ovat kuitenkin vielä kymmenien vuosien päässä. Jotta maailma selviäisi tästä globaalista muoviongelma-  
sääkähdyksellä, tarvitaan paljon uusia tutkimuksia ja mikrobien aktiivisuuden kehittämistä, jotta biotekninen kierrätys olisi jonakin päivänä mahdollinen.

**Lähdeluettelo**

AKUTSU, Y., NAKAJIMA, T., NOMURA, N. & NAKAHARA, T. 1998. Purification and Properties of a Polyester Polyurethane Degrading Enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. Vol. 64, 62–67.

ASMITA, K., SHUBHAMSINGH, T. & TEJASHREE, S. 2015. Isolation of Plastic Degrading Micro-organisms from Soil Samples Collected at Various Locations in Mumbai, India. Vol. 4 (3), 77–85. ISSN 2319–1414.

AUSTIN, H.P., ALLEN, M.D., DONOHOE, B.S., RORRER, N.A., KEARNS, F.L., SILVEIRA, R.L., POLLARD, B.C., DOMINICK, G., DUMAN, R., EL OMARI, K., MYKHAYLYK, V., WAGNER, A., MICHENER, W.E., AMORE, A., SKAF, M.S., CROWLEY, M.F., THORNE, A.W., JOHNSON, C.W., WOODCOCK, H.L., MCGEEHAN, J.E. & BECKHAM, G.T. 2018. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 115 (19), 4350–4357.

AWASTHI, S., SRIVASTAVA, P., SINGH, P., TIWARY, D. & MISHRA, P. 2017. Biodegradation of thermally treated high-density polyethylene (HDPE) by *Klebsiella pneumoniae* CH001. *3 Biotech*. Vol. 7 (5), 1–10. ISSN 2190-572X.

BALASUBRAMANIAN, V., NATARAJAN, K., HEMAMBIKA, B., RAMESH, N., SUMATHI, C.s., KOTTAIMUTHU, R. & RAJESH KANNAN, V. 2010. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 51 (2), 205–211. ISSN 0266-8254.

EP2922906B1. 2015. Method for recycling plastic products. BOISART, C. & MAILLE, E. 13795210.7, Julk. 30.9.2015.

BUENO-FERRER, C., GARRIGÓS, M.C. & JIMÉNEZ, A. 2010. Characterization and thermal stability of poly(vinyl chloride) plasticized with epoxidized soybean oil for food packaging. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 95 (11), 2207–2212. ISSN 0141-3910.

CALIL, M.R., GABOARDI, F., GUEDES, C.G.F. & ROSA, D.S. 2006. Comparison of the biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone), cellulose acetate and their blends by the Sturm test and selected cultured fungi. *Polymer Testing*. Vol. 25 (5), 597–604. ISSN 0142-9418.

Carbios. 2020. LEADING THE PLASTICS CIRCULAR ECONOMY. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 20.2.2021]. Saatavissa: <https://carbios.fr/app/uploads/2020/09/Carbios-Presentation-September-2020.pdf>.

Carbios. 2016. CARBIOS - Innovative solutions for reinventing the lifecycle of plastic. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 20.2.2021]. Saatavissa: <https://carbios.fr/en/carbios-innovative-solutions-for-reinventing-the-lifecycle-of-plastic-2/>.

DANG, T.C.H., NGUYEN, D.T., THAI, H., NGUYEN, T.C., TRAN, T.T.H., LE, V.H., NGUYEN, V.H., TRAN, X.B., PAHM, T.P.T., NGUYEN, T.G. & NGUYEN, Q.T. 2018. Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam. Vol. 9, 1–11.

DANSO, D., CHOW, J. & STREIT, W. 2019. Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. Vol. 85 (19), 1–11.

WO 2017/198786 A1. 2017. A process for degrading plastic products. DESROUSSEAUX, M., TEXIER, H., DUQUESNE, S., MARTY, A., ALOUI DALIBEY, M. & CHATEAU, M. PCT/EP2017/062028.

EBLER, A., HEUMANN, S., BRÜCKNER, T., ARAUJO, R., CAVACO-PAULO, A., KAUFMANN, F., KROUTIL, W. & GUEBITZ, G. 2009. Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. Vol. 143 (3), 207–212.

FLEMMING, H. 1998. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials\*. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 59 (1–3), 309–315. ISSN 0141-3910.

GAJENDIRAN, A., KRISHNAMOORTHY, S. & ABRAHAM, J. 2016. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. Vol. 6 (52), 1–6.

GARCIA, P. 2016. Polypropylene: Properties, Uses, and Benefits: Polypropylene biodegradation. 147–148. ISBN: 978-1-53610-008-2.

GHOSH, S.K., PAL, S. & RAY, S. 2013. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research International; Environ Sci Pollut Res Int*. Vol. 20 (7), 4339–4355. ISSN 0944-1344.

GIACOMUCCI, L., RADDADI, N., SOCCIO, M., LOTTI, N. & FAVA, F. 2019. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotechnology; N Biotechnol*. Vol. 52, 35–41. ISSN 1871-6784.

GU, J. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 52 (2), 69–91. ISSN 0964-8305.

GUMARGALIEVA, K.Z., ZAIKOV, G.E., POLISHCHUK, A.Y., VINOKUROMA, T.I. & ADAMYAN, A.A., 2000. Handbook of Polyolefins: Biocompatibility and Biodeterioration of Polyolefins. Vol 59 (2). ISBN 0824786033.

HAN, X., LIU, W., HUANG, J., MA, J., ZHENG, Y., KO, T., XU, L., CHENG, Y., CHEN, C. & GUO, R. 2017. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. Vol. 8 (2106), 1–6.

HO, B.T., ROBERTS, T.K. & LUCAS, S., 2018. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 38 (2), 308–320. ISSN 0738-8551.

HOWARD, G.T., MACKIE, R.I., CANN, I.K.O., OHENE-ADJEI, S., ABOUDEHEN, K.S., DUOS, B.G. & CHILDERS, G.W., 2007. Effect of insertional mutations in the *pueA* and *pueB* genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained within a gene cluster. Vol. 103, 2074–2083. ISSN 1364-5072.

HOWARD, G.T. & BLAKE, R.C. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester–polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase–protease enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 42 (4), 213–220. ISSN 0964-8305.

HUNG, C., ZINGARELLI, S., NADEAU, L., BIFFINGER, J., DRAKE, C., CROUCH, A., BARLOW, D., RUSSELL, J. & CROOKES-GOODSON W. 2016. Carbon Catabolite



Repression and Impranil Polyurethane Degradation in *Pseudomonas protegens* Strain Pf-5. Vol. 82 (20), 6080–6090.

IMMONEN, K. 2018. PlastBug – Projekti ja muovien biohajoavuus. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 5.3.2021]. Saatavissa: [https://clicinnovation.fi/wp-content/uploads/2018/11/4\\_Kirsi-Immonen\\_VTT\\_PlastBug-1.pdf](https://clicinnovation.fi/wp-content/uploads/2018/11/4_Kirsi-Immonen_VTT_PlastBug-1.pdf).

JAISWAL, S., SHARMA, B. & SHUKLA, P. 2020. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology & Innovation*. Vol. 17, 100567. ISSN 2352-1864.

JEON, H.J. & KIM, M.N. 2016. Isolation of mesophilic bacterium for biodegradation of polypropylene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 115, 244–249. ISSN 0964-8305.

JIANG, L. & ZHANG, J., 2013. Biodegradable Polymers and Polymer Blends, *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. William Andrew Publishing. 109–128. ISBN 978-1-4557-2834-3.

KAMIMURA, A., YAMAMOTO, S. & YAMADA, K. 2011. Depolymerization of Unsaturated Polyesters and Waste Fiber-Reinforced Plastics by using Ionic Liquids: The Use of Microwaves to Accelerate the Reaction Rate. *ChemSusChem*. Vol. 4 (5), 644–649. ISSN 1864-5631.

KOIVURANTA, K. 2019. Tulevaisuuden mahdollisuus muovin käsittelylle? (PlastBug). 1–16. [Viitattu 28.1.2021]. Saatavissa: <https://materiaalitkiertoon.fi/download/no-name/%7B67EBD752-0D32-4F3F-A5FC-573705B72252%7D/146406>.

KOIVURANTA, K. 2018. Mikrobeilla merten muovijätettä vastaan. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 5.2.2021]. Saatavissa: <https://www.vttresearch.com/fi/uutiset-ja-tarinat/tuore-tutkimus-mikrobeilla-merten-muovijatetta-vastaan>.

KUMAR SEN, S. & RAUT, S. 2015. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Vol. 3 (1), 462–473. ISSN 2213-3437.

LEBRETON, L., SLAT, B., FERRARI, F., SAINTE-ROSE, B., AITKEN, J., MARTHOUSE, R., HAJBANE, S., CUNSOLO, S., SCHWARZ, A., LEVIVIER, A., NOBLE, K., DEBELJAK,

P., MARAL, H., SCHOENEICH-ARGENT, R., BRAMBINI, R. & REISSER, J. 2018. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. Vol. 8 (4666), 1–15.

LUCAS, N., BIENAIME, C., BELLOY, C., QUENEUDEC, M., SILVESTRE, F. & NAVASAUCEO, J. 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere (Oxford)*. Vol. 73 (4), 429–442. ISSN 0045-6535.

US10,385,183B2. 2019. Process of recycling mixed PET plastic articles. MAILLE, E.US15/310,458. Julk. 20.8.2019.

MATSUMIYA, Y., MURATA, N., TANABE, E. & KUBO, M. 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. Vol. 108, 1946–1953.

ORR, I., HADAR, Y. & SIVAN, A. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 65 (1), 97–104. ISSN 0175-7598.

PATIL, R. & BADGE, U.S. 2012. Isolation of polyvinyl chloride degrading bacterial strains from environmental samples using enrichment culture technique. 7947–7956. ISSN 1684–5315.

PATRICK, S. 2005. Practical guide to polyvinyl chloride. Rapra Technology. 1–40. ISBN 1-280-85649-1.

PIRC, U., VIDMAR, M., MOZER, A. & KRŽAN, A. 2016. Emissions of microplastic fibers from microfiber fleece during domestic washing. *Environmental Science and Pollution Research International*. Vol. 23 (21), 22206–22211. ISSN 0944-1344.

Plasticity. 2013. Module 1: Resource-full Waste. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 2.3.2021]. Saata-vissa: [http://2013.igem.org/Team:Imperial\\_College/Waste\\_Degradation:\\_SRF](http://2013.igem.org/Team:Imperial_College/Waste_Degradation:_SRF).

PlasticsEurope. 2020. Plastics – the Facts 2020. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 1.3.2021]. Saata-vissa: [https://www.plasticseurope.org/application/files/5716/0752/4286/AF\\_Plastics\\_the\\_facts-WEB-2020-ING\\_FINAL.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/5716/0752/4286/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf).

- RAHMAN, M.M., RABBANI, M.M. & SAHA, J.K. 2019. Polyurethane and Its Derivatives: Functional Polymers. Springer International Publishing. 225–240. ISBN 9783319959863.
- ROSCHIER, S., MIKKOLA, J., VÄRRE, U. & SAARIO, M. 2020. Muovijätteen kemialliset hyödyntämiskäytännöt ja -markkinat kiertotaloudessa. Vol. 64, 26–27. ISSN 1797-3562.
- ROY, P.K., TITUS, S., SUREKHA, P., TULSI, E., DESHMUKH, C. & RAJAGOPAL, C. 2008. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 93 (10), 1917–1922. ISSN 0141-3910.
- SAVOLDELLI, J., TOMBACK, D. & SAVOLDELLI, H., 2017. Breaking down polystyrene through the application of a two-step thermal degradation and bacterial method to produce usable byproducts. *Waste Management*. Vol. 60, 123–126. ISSN 0956-053X.
- SHAH, A.A., FARIHA, H., HAMEED, A. & SAFIA, A., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. Vol. 26 (3), 246–265. ISSN 0734-9750.
- SHAHNAWAZ, M., SANGALE, M. & ADE, A. 2016. Rhizosphere of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. as a landmark for polythene degrading bacteria. *Environmental Science and Pollution Research International*. Vol. 23 (14), 14621–14635. ISSN 0944-1344.
- SHIMPI, N., BORANE, M., MISHRA, S., KADAM, M. & SONAWANE, S.S. 2016. Biodegradation of Isotactic Polypropylene (iPP)/Poly(lactic acid) (PLA) and iPP/PLA/Nano Calcium Carbonates Using *Phanerochaete chrysosporium*. Vol. 37 (2), 1–9.
- SKARIYACHAN, S., PATIL, A.A., SHANKAR, A., MANJUNATH, M., BACHAPPANAVAR, N. & KIRAN, S. 2018. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 149, 52–68. ISSN 0141-3910.
- STEPIEN, A.E., ZEBROWSKI, J., PISZCZYK, Ł, BOYKO, V.V., RIABOV, S.V., DMITRIEVA, T., BORTNITSKIY, V.I., GONCHAR, M., WOJNAROWSKA-NOWAK, R. & RYSZKOWSKA, J. 2017. Assessment of the impact of bacteria *Pseudomonas denitrificans*,

*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and yeast *Yarrowia lipolytica* on commercial poly(ether urethanes). *Polymer Testing*. Vol. 63, 484–493. ISSN 0142-9418.

SUDHAKAR, M., DOBLE, M., MURTHY, P.S. & VENKATESAN, R. 2008. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 61 (3), 203–213. ISSN 0964-8305.

SURESH, B., MARUTHAMUTHU, S., KHARE, A., PALANISAMY, N., MURALIDHARAN, V.S., RAGUNATHAN, R., KANNAN, M. & PANDIYARAJ, K.N., 2011. Influence of thermal oxidation on surface and thermo-mechanical properties of polyethylene. *Journal of Polymer Research*. Vol. 18 (6), 2175–2184. ISSN 1572-8935.

TOKIWA, Y. & CALABIA, B. 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. Sep. Vol. 72 (2), 244–251. ISSN 0175-7598.

TOKIWA, Y., CALABIA, B., UGWU, C. & AIBA, S. 2009. Biodegradability of Plastics. Vol. 10, 3722–3742. ISSN 1422-0067.

TOURNIER, V., TOPHAM, C.M., GILLES, A., DAVID, B., FOLGOAS, C., MOYA-LECLAIR, E., KAMIONKA, E., DESROUSSEAUX, M.-., TEXIER, H., GAVALDA, S., COT, M., GUÉMARD, E., DALIBEY, M., NOMME, J., CIOCI, G., BARBE, S., CHATEAU, M., ANDRÉ, I., DUQUESNE, S. & MARTY, A., 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*. Vol. 580 (7802), 216–219. ISSN 1476-4687.

URBANEK, A.K., RYMOWICZ, W. & MIROŃCZUK, A.M. 2018. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology; Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 102 (18), 7669–7678. ISSN 0175-7598.

VIVI, V.K., MARTINS-FRANCHETTI, S.M. & ATTILI-ANGELIS, D. 2019. Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. Vol. 64 (1), 1–7.

WALLACE, N.E., ADAMS, M.C., CHAFIN, A.C., JONES, D.D., TSUI, C.L. & GRUBER, T.D. 2020. The highly crystalline PET found in plastic water bottles does not support the growth of the PETase-producing bacterium *Ideonella sakaiensis*. *Environmental Microbiology Reports*. Vol. 12 (5), 578–582. ISSN 1758-2229.

WARD, P.G., GOFF, M., DONNER, M., KAMINSKY, W. & O'CONNOR, K.E. 2006. A Two Step Chemo-biotechnological Conversion of Polystyrene to a Biodegradable Thermoplastic. Vol. 40 (7), 2433–2437.

WATANABE, T., OHTAKE, Y., ASABE, H., MURAKAMI, N. & FURUKAWA, M., 2009. Biodegradability and degrading microbes of low-density polyethylene. Journal of Applied Polymer Science. Vol. 111 (1), 551–559. ISSN 0021-8995.

ICSC 1487 – POLYVINYLYLIKLOORIDI. 2017. WHO & ILO. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 20.1.2021]. Saatavissa: [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_lang=fi&p\\_card\\_id=1487&p\\_version=2](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=fi&p_card_id=1487&p_version=2).

WWF. 2019. Merten muoviroska. [Verkkoaineisto]. [Viitattu 15.3.2021]. Saatavissa: <https://wwf.fi/uhat/merten-muoviroska/>.

YOSHIDA, S., HIRAGA, K., TAKEHANA, T., TANIGUCHI, I., YAMAJI, H., MAEDA, Y., TOYOHARA, K., MIYAMOTO, K., KIMURA, Y. & ODA, K. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). Vol. 351 (6278), 1196–1199.