

Pro gradu -tutkielma

**Polyeteenimikromuovipartikkeleiden hajoaminen
boreaalisen vyöhykkeen järvivedessä**

Petra Kautonen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

22.11.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede

Petra Kautonen: Polyeteenimikromuovipartikkeleiden hajoaminen
boreaalisen vyöhykkeen järvivedessä
Pro gradu -tutkielma: 39 s.
Työn ohjaajat: Dosentti Sami Taipale ja Professori Marja Tirola ja
Professori Jussi Kukkonen
Tarkastajat: Dosentti Sami Taipale ja Tohtori Pauliina Salmi
Marraskuu 2020

Hakusanat: hiili, isotooppi, mikrobiyhteisö, PE

Lisääntynyt mikromuovien runsaus vesistöissä on yksi suurimmista tämän hetkisistä ympäristöongelmista. Muovit ovat kohtalaisen resistenttejä hajoamiselle, ja niiden hajoamisen on arvioitu kestävän sadoista vuosista tuhansiin vuosiin. Todisteita mikrobien kyvystä hajottaa mikromuovia on jo saatu, mutta tarkkaa hajoamisnopeutta luonnonvesissä ei ole määritetty. Tutkimukseni tavoitteena oli selvittää, kuinka nopeasti eri järviyppien mikrobit hajottavat polyeteenin mikromuovipartikkeleita, ja kuinka monta vuotta kuluisi niiden täydelliseen hajoamiseen boreaalisen vyöhykkeen järvissä. Tutkimuksessa käytettiin yhdistespesifistä isotooppianalyysiä sekä kaasukromatografiaa selvittämään 99 % ¹³C -leimatun polyeteenin hajoamista humuspitoisessa (H), kirkkaassa (C) ja keinotekoisessa (M) järvivedessä. Tutkimustulosteni mukaan hajoaminen luonnonvesissä (H, C) kestäisi 10–144 vuotta, kun hajoaminen ilman mikrobitoimintaa (M) kestäisi jopa 192–407 vuotta. Polyeteenin hajoaminen ei ollut kuitenkaan merkittävästi nopeampaa humusvesissä (10–12 vuotta) kuin kirkkaissa järvivesissä (26–144 vuotta). Tutkimukseni osoitti, että mineralisaation lisäksi mikrobit käyttivät polyeteeniä uuden biomassan rakentamiseen merkittävästi enemmän humusvesissä kuin kirkkaissa järvivesissä. Tutkimustulokseni viittaavat, että polyeteeniä hajottavat mikrobit ovat gram-negatiivisia bakteereita, sillä näiden fosfolipidibiomarkkerit olivat leimaantuneet niin kirkkaassa kuin humusvesissä. Tutkimukseni osoittaa, että polyeteenimikromuovipartikkelit hajoavat luultua nopeammin optimiolosuhteissa, mutta jopa satoja vuosia ilman hajottajamikrobeja.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental science

Petra Kautonen: Degradation of polyethylene microplastic particles in lake water of the boreal zone
MSc thesis: 39 p.
Supervisors: Docent Sami Taipale and Professor Marja Tirola and Professor Jussi Kukkonen
Inspectors: Docent Sami Taipale and PhD. Pauliina Salmi
November 2020

Keywords: carbon, isotope, microbial community, PE

The increasing abundance of microplastics (MP) in aquatic ecosystems is currently one of the greatest environmental concerns because of their resistance to breakdown. It is estimated that the complete degradation of MP would take decades to centuries. Humic lakes in the boreal zone are rich in naturally dissolved organic matter, which is why there are a wide range of microbes that degrade natural polymers. Researchers have already found out that microbes are capable of degrading MP and use MP carbon for their growth. However, the specific MP degradation rate in the natural waters is still lacking. The aim of my research was to examine how fast microbes in different types of waters can degrade polyethylene (PE) MP particles and how many years it would take for their complete degradation. We used compound-specific isotope analysis and gas chromatography to study degradation of labelled 99 % ¹³C-PE-MP in humic (H), clear (C) and artificial (M) lake waters. According to my results, the degradation would take 10–144 years in natural waters (H, C) and without microbial activities (M) it would take 192–407 years. However, the degradation rate was not significantly faster in humic waters compared to clear lake waters. My study indicated that besides mineralization, microbes used PE-MP to build new biomass both in humic and clear waters, but the rates were significantly faster in humic waters. My results indicate that microbes that degrade PE-MP are gram-negative bacteria because their phospholipid-biomarkers were labelled in both natural lake waters. My study shows that PE-MP particles are degraded faster than expected in optimum circumstances, but it could take several centuries without decomposing microbes.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	6
2.1 Aineisto	6
2.2 Tutkimuksen alustaminen.....	7
2.3 Kaasumittaukset	8
2.3.1 Kaasu- ja nestenäytteiden analysointi kaasukromatografilla	9
2.3.2 Kaasu- ja nestenäytteiden isotoopit (GC-IRMS)	9
2.3.3 Aineiston käsittely	10
2.4 Mikrobyhteisöiden rakenne ja biomassa	12
2.4.1 Lipidien uutto	13
2.4.2 Fraktiointi	13
2.4.3 Rasvahappojen metylointi.....	14
2.4.4 Rasvahappojen analysointi GC-massaspektrometrillä	14
2.4.5 Rasvahappojen hiilen isotooppien määrittäminen.....	15
2.4.6 Aineiston käsittely	15
2.5 Koko aineiston tilastollinen testaus	18
3 TULOKSET	19
3.1 Kaasumittaukset	19
3.1.1 Kaasunäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -tulokset	20
3.1.2 Kaasu- ja nestenäytteiden leimaantuminen PE-mikromuovin hiilellä....	22
3.2 Mikrobyhteisöiden rakenne ja biomassa	24
3.2.1 Solukalvojen leimaantuminen PE-mikromuovin hiilellä	24
3.3 Mineralisaatio ja uuden biomassan rakentaminen.....	27

3.4 PE-mikromuovin hiilen hajoaminen boreaalisissa järvissä.....	30
4 TULOSTEN TARKASTELU	32
5 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	35
KIITOKSET	35
KIRJALLISUUS.....	36

1 JOHDANTO

Muovi on kasvava ympäristöongelma ympäri maailmaa (Cole ym. 2011, Horton ym. 2017). Muovit ovat synteettisiä tai puolisynteettisiä, hiilen pitkistä molekyyliketjuista eli polymeereistä koostuvia materiaaleja. Muovimateriaaleista käytetyimpiä ovat polyeteeni, polypropeeni, polystyreeni, polyamidi ja polyesteri, jotka yhdessä muodostavat noin 90 % koko maailman muovintuotannosta (Taipale ym. 2019). Muovia on tuotettu massatuotannolla 1940-luvulta lähtien (Cole ym. 2011). Nykypäivänä muovia löytyy lähes kaikkialta, sillä muovin ominaisuudet, kuten kestävyys, tekevät siitä houkuttelevan käyttää. Samalla muovin ominaisuudet tekevät siitä erittäin vaikean hävittää, sillä muovin kestävyys estää sen maatumista (Müller 2000). Mikään massatuotetuista muovilaaduista ei maadu merkittäväällä tavalla (Geyer ym. 2017). Lisäksi, erilaiset muovityypit eroavat ominaisuuksiltaan esimerkiksi kelluvuuden osalta, jonka vuoksi niiden ympäristökäyttäytyminen voi olla erilaista (Kooi ym. 2018). Varsinkin muovit, jotka päätyvät vesistöihin, aiheuttavat huolta niistä aiheutuvien ongelmien takia. Suurten muovijäänteiden, eli makromuovien, vaikutus ympäristöön on ollut tutkimuksen kohteena jo vuosia. Näiden muovien tiedetään aiheuttavan vakavia haittoja muun muassa linnuille, nisäkkäille, kaloille ja matelijoille eliöiden jäädessä jumiin tai eliöiden tukehtuessa muovipartikkeleihin (Cole ym. 2011).

Lähivuosina on kuitenkin havahduttu myös toiseen muoveista aiheutuvaan ympäristölliseen uhkaan, mikromuoveihin. Mikromuovit ovat hyvin pieniä, yleisesti alle 5 mm mittaisina pidettyjä muovipartikkeleita, joita käytetään tarkoituksellisesti kosmetiikassa, ihonhoitotuotteissa ja lääkkeissä, ja joita irtoaa makromuovien hajoamisen yhteydessä (Cole ym. 2011, Auta ym. 2017). Kosmetiikan mikromuovia päätyy vesistöihin teollisten tai kotitalouksien viemärien kautta. Lisäksi synteettisistä materiaaleista valmistetuista vaatteista irtoaa joko suoraan tai pesun yhteydessä mikromuovipartikkeleita, jotka päätyvät jätevedenpuhdistuslaitoksiin ja sitä kautta vesistöihin. Vaikka osa

jätevedenpuhdistamoista pystyy suodattamaan jätevedestä jopa 95 % - 99 % mikromuoveista (Talvitie 2017, Railo ym. 2018), suurinta osaa jätevedenpuhdistuslaitoksista ei ole suunniteltu poistamaan täysin mikromuoveja jätevedestä (Anderson ym. 2016). Sisävesiin päätyy mikromuovia myös mahdollisesti valuntana pelloilta, jossa on käytetty lietettä lannoitteena maanviljelyssä (Anderson ym. 2016). Lisäksi, makromuoveista irronneita partikkeleita päätyy valunnan, tuulen ja virtauksien kautta vesistöihin, ja lopulta meriin (Auta ym. 2017). Myrskyt ja sään ääri-ilmiöt edesauttavat mikromuovien kulkeutumista maalta vesistöihin (Anderson ym. 2016).

Mikromuoveja on tutkittu vasta vähän aikaa, mutta niiden potentiaalisen uhan vuoksi tieteenala on alati kasvava (Cole ym. 2011). Carpenter ym. (1972) löysivät ensimmäisen kerran mikromuoveja aavalta mereltä 1970-luvulla, ja tarkempien tutkimusten valossa viime vuosikymmenen aikana on todistettu, että mikromuovit ovat laajalle levinneitä ja kaikkialla läsnä olevia vesiekosysteemeissä. Niiden tiedetään olevan potentiaalinen uhka lajistolle. Mikromuovien pienen koon takia, ne kulkeutuvat helposti organismeihin ravintoverkon kautta (Railo ym. 2018). Mikromuovien koostumus ja suhteellisen suuri pinta-ala tekevät niistä taipuvaisia tarttumaan vesitse kulkeutuviin orgaanisiin epäpuhtauksiin, keräten näin itseensä erilaisia ympäristömyrkyjä (Fendall ja Sewell 2009). Näin ollen mikromuovien syöminen voi aiheuttaa myrkkujen pääsyn ruokaverkkoon ja siellä eteenpäin siirtymisen (Cole ym. 2011). Pelätään, että mikromuovin tarttuminen toksisiin aineisiin, kuten bisfenoli-A:han ja DDT:hen, ja näiden kulkeutuminen ravintoverkossa voisi aiheuttaa hedelmättömyyttä, geneettisiä häiriöitä, myrkytyksiä ja kuolleisuuden lisääntymistä sekä vesieliöissä että suurissa määrin nieltynä myös ihmisissä (Auta ym. 2017).

Tutkimusten perusteella mikromuovit voivat päätyä vesiorganismeihin eri tavoin, ja nieltynä mikromuovien kohtalo organismissa voi olla vaihteleva. Mikromuovi voi poistua organismin kehosta kuonanerityksen kautta, jolloin siitä ei aiheudu pitkäkestoista haittaa (Browne ym. 2008). Mikromuovi voi myös siirtyä organismin kudosten välillä, ja jäädä elimistöön (Hall ym. 2015). Nieltynä mikromuovi voi aiheuttaa erilaisia haittoja organismin elintoiminnoissa ja kehityksessä (Lu ym.

2016). Vaikkakin mikromuovin toksisia vaikutuksia eläinplanktonille ja kaloille tutkitaan paljon, mikromuovien ympäristökohtaloa akvaattisissa ekosysteemeissä on vasta vähän tutkittu (Taipale ym. 2019, Anderson ym. 2016).

Polymeerityypeistä polyeteeniä (PE) löytyy meristä ja sisävesistöistä selkeästi eniten (pelkästään meristä löytyy kevyttä polyeteeniä, LDPE:tä, 21 % ja raskasta polyeteeniä, HDPE:tä, 17 % kaikesta muoviroskasta) (Andrady 2011), ja se onkin tutkimuksissa käytettävistä muovilajikkeista suosituin (Taipale ym. 2019). Muovi voi hajota biologisesti tai valon, lämmön, mekaanisen kulutuksen, lämpöhapetuksen tai hydrolyysin avulla (Anderson ym. 2016). Polyeteeni hajoaa lähinnä UV-B-valohapetuksen ja sitä seuraavan lämpöhapetuksen avulla. Lopputuloksena syntyy mikro-kokoisia tai jopa nano-kokoisia (kokoluokka < 100 nm) muovipartikkeleita, joista jälkimmäisien olemassaoloa on toistaiseksi vielä vaikea varmentaa metodologisten rajoitteiden takia (Xu ym. 2020). Nämä muovipartikkelit voivat kuitenkin hajota vielä lisää, esimerkiksi biologisen hajotuksen ansiosta, jossa muovin hiili muutetaan hiilidioksidiksi ja assimiloidaan biomassaan (Anderson ym. 2016). Muovipartikkeleiden hajoaminen UV-valon ansiosta on kuitenkin hyvin paljon hitaampaa vedessä kuin maaperällä johtuen veden matalammasta lämpötilasta ja happitasosta. Muoveja pidetäänkin yleisesti hyvin vaikeasti hajoavina akvaattisissa elinympäristöissä, ja aika, joka kuluisi muovien mineralisaatioon (hajoaminen esim. hapetus-pelkistysreaktio; hiili muuttuu uloshengitetyksi hiilidioksidiksi) arvioidaan olevan sadoista vuosista tuhansiin vuosiin (Anderson ym. 2016).

Mikromuovien hajoamista on tutkimusten valossa havaittu epäsuorien metodien perusteella komposteissa, maaperässä ja sedimenteissä (Chandra ym. 1998, Weinstein ym. 2016, Auta ym. 2017, Auta ym. 2018) sekä merisienten toiminnan ansiosta (Paco ym. 2017). Mikrobiyhteisöiden on myös todistettu kolonisoivan mikromuovipartikkelien pintaa akvaattisissa elinympäristöissä (Jiang ym. 2017). Vesien mikrobit voivat täten mahdollisesti vaikuttaa mikromuovien ympäristökohtaloon ravintoketjussa (Restrepo-Flórez ym. 2014). Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että mikromuovilla voi olla korkeissa pitoisuuksissa estävä vaikutus levän ja eläinplanktonin toimintakykyyn (Cui ym. 2017, Mendoza ym.

2017, Nolte ym. 2017), mutta Taipale ym. (2019) suorittaman tutkimuksen perusteella PE-mikromuovin ainoa toksikologinen vaikutus havaittiin nielulevällä ja vesikirpuilla vedessä, jossa ei ollut ollenkaan mikrobeja.

Pienet, niukkaravinteiset humusjärvet (liunneen orgaanisen hiilen määrä, DOC > 10 mg/l) ovat yleisimpiä järvityyppejä boreaalisella vyöhykkeellä, ja niiden määrän uskotaan kasvavan ilmastonmuutoksen myötä (Faithfull ym. 2015). Dystrofisissa järvissä, eli humusjärvissä, veden pH on alhainen ja veden väri tumma. Tämä rajoittaa järven perustuotantoja sekä eliöiden selviytymistä järvessä (Arvola ym. 1999). Tällaisissa järvissä tyydyttymättömiä rasvahappoja, jotka ovat ravinteellisesti haluttavimpia, löytyy vain niukasti (Monteith ym. 2007). Rasvahapot ovat vesieliöiden tärkein lipidien rakenneosat, jotka toimivat myös hyvänä indikaattorina pienhiukkasten mahdolliselle ravinteelliselle arvolla (Desvillettes ym. 1997). Tarkemmin, fosfolipidirasvahapot (PLFA) ovat mikrobien solukalvojen tärkein rakenneosat, ja PLFA-rasvahappoja tutkimalla on mahdollista tunnistaa esimerkiksi näytteestä löytyviä organismiryhmiä, sillä rasvahapot toimivat myös hyvinä biomarkkereina organismeille (Boschker ja Middelburg 2002, Carvalho ja Caramujo 2014). Dystrofisissa järvissä mikromuoveja voitaisiin pitää vaihtoehtoisena hiililähteenä rasvahappojen tuottamiseen. Dystrofiset järvet voivat olla hiilirajoitteisia, jonka tähden järven mikrobisto on sopeutunut hajottamaan vaikeasti hajoavia yhdisteitä, kuten mikromuoveja. Kuitenkin toistaiseksi, vain Yoshida ym. (2016) ja Taipale ym. (2019) ovat todistaneet mikrobien kyvyn hajottaa mikromuovia, jolloin myöskin pro gradun aihe on ajankohtainen.

Orgaaninen hiili ylläpitää ekosysteemejä kahdesta eri lähteestä. Endogeeninen hiili tuotetaan fotosynteesissä ekosysteemin sisällä autotrofisten eli omavaraisten eliöiden toimesta. Eksogeeninen eli ulkoinen hiili on tuotettu jossain muualla, ja tuotu ekosysteemin sisään. Eksogeeniset orgaanisen hiilen virrat ekosysteemin sisään ovat usein suuria, mutta tämä materiaali on sitkeää ja sitä on vaikea assimiloida eli käyttää omaan kasvuun, toisin kuin endogeenisesti tuotettua orgaanista materiaalia, jota on helpompi hyödyntää (Pace ym. 2004). Järvet ovat tyypillisiä hiilidioksidin (CO₂) lähteitä ilmakehään. Hiilidioksidia vapautuu ilmakehään järvistä sekä endogeenisesti prosessoidusta orgaanisesta hiilestä että

eksogeenisesti tuotetusta hiilestä, joka on siirtynyt järviin. Systemien soluhengitys ylittää perustuotannon monissa järvissä, mikä antaa ymmärtää, että eksogeenistä orgaanista hiiltä käytetään hyödyksi. Mikäli akvaattiset bakteerit käyttävät eksogeenistä liuennutta orgaanista hiiltä (DOC) hyödykseen, on näin ollen mahdollista tunnistaa kyseinen hiilen lähde (Pace ym. 2004).

Hiilellä on kaksi pysyvää isotooppia: ^{12}C (98,89 %) ja ^{13}C (1,11 %). $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isotooppisuhdetta voidaan käyttää hyödyksi hiilen lähteen tunnistamisessa, ja tätä suhdetta käytetäänkin paljon hyödyksi tutkittaessa, mitä eliöt ovat käyttäneet ravinnokseen. Eliöt eivät käytä tasapuolisesti molempia isotooppeja hyödykseen, vaan suosivat voimakkaasti hiilen kevyempää ^{12}C -isotooppia. Koska yhden alkuaineen eri isotoopeilla on neutronien lukumäärän eroavaisuuden johdosta erisuuruiset massat, niillä on erilaiset kineettiset ja termodynaamiset ominaisuudet (mm. eroavaisuudet reaktioiden tahdissa ja lämpökapasiteetissa) kemiallisissa reaktioissa. Nämä eroavaisuudet mahdollistavat sen, että isotooppisesti merkityt molekyylit voidaan erotella toisistaan kemiallisissa prosesseissa (Schwarcz ja Schoeninger 1991). Pysyvien isotooppien leimauskokeita on käytetty muun muassa jäljittämään hiilen kiertoa ja ravinteiden siirtoa ravintoverkossa (Michener ja Kaufman 2007). Lisäksi, yhdistespesifinen isotooppianalyysi mahdollistaa mikromuovin havaitsemisen biomolekylaarisella tasolla, ja se pystyy havaitsemaan jopa pienimmät isotooppien muutokset (0,0001 %) erittäin pienissä pitoisuuksissa, toisin kuin esimerkiksi perinteinen kaasukromatografimassaspektrometri, joka vaatii vähintään 1 % muutoksen ^{13}C -pitoisuudessa (Boschker ja Middelburg 2002). Näin ollen pitäisi olla mahdollista jäljittää ^{13}C -hiilellä rikastettu mikromuovin kulkeutuminen näytteissä, ja todistaa mikrobien kyky hyödyntää mikromuovia omaan kasvuun.

Polyeteenin tiedetään hajoavan hyvin hitaasti, mutta tarkkaa hajoamisnopeutta ole määritetty. Pro gradun kokeellisessa työssä lisättiin ^{13}C -leimattuja PE-mikromuovipartikkeleita kolmeen eri koeverteen (humuspitoinen järvivesi, kirkasvetinen järvivesi ja keinotekoinen makea vesi) ja tutkittiin näiden käsittelyjen mahdollista vaikutusta tuloksiin. Tutkimuksessa haluttiin selvittää, kuinka nopeasti eri järviyypin mikrobit hajottavat koevesiin lisättyjä PE-

mikromuovipartikkeleita (tutkimuskysymys 1). Hypoteesina oli, että PE-mikromuovin hajoaminen ei eroa erityyppisten järvivesien välillä. Haluttiin myös selvittää, kuinka monta vuotta kuluisi laskennallisesti PE-mikromuovipartikkelien täydelliseen hajoamiseen boreaalisen vyöhykkeen järvissä (tutkimuskysymys 2). Lisäksi oltiin kiinnostuneita selvittämään, kuinka paljon PE-mikromuovin hiilestä mineralisoituu ja kuinka paljon hiiltä assimiloituu sitä hyödyntävien mikrobien biomassaan (tutkimuskysymys 3).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Tutkimuksen kokeellinen osuus suoritettiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriossa. Tutkimuksen koevesinä käytettiin kahta erityyppistä järvivettä, joista oli otettu vesinäytteet jo aikaisemmin, ja joita oli säilytetty kylmässä. Kirkasvetinen järvivesi (DOC < 10 mg C/l) oli peräisin Lahden Vesijärvestä (Enonselkä) ja humuspitoinen järvivesi (DOC > 10 mg C/l) oli peräisin Evon metsäalueen Haukijärvestä (Taulukko 1). Kolmantena koevetenä käytettiin keinotekoisista levämediaa (MWC+Se, Guillard ja Lorenzen 1972, Karin Rengefors pers. com.). Mikromuovina käytettiin ¹³C-leimattua polyeteeniä (polyeteeni-¹³C₂, Sigma-Aldrich). Käytetyn PE-mikromuovin partikkelien koko vaihteli 3-40 µm välillä (99,99 % < 20 µm). Tutkimuksessa käytetty PE-mikromuovi oli peräisin Marja Tiirolan tutkimusryhmältä. Kirkasvetisen järven vesinäyte oli otettu kesällä 2018 ja humuspitoisen järven vesinäyte oli otettu syksyllä 2018. Keinotekoisesti valmistettu koevesi oli puolestaan steriili, eikä siinä pitänyt olla lainkaan mikrobitoimintaa (Taulukko 1).

Taulukko 1. Keinotekoisien, kirkasvetisten ja humuspitoisten koeveden näytteenottoapaikan sijainti (leveys- ja korkeusaste), järvivesityyppi, näytteenottoajankohta ja liuenneen orgaanisen hiilen määrä (DOC, mg C/l).

Koevesi	Leveysaste	Korkeusaste	Järvivesityyppi	Kausi	DOC (mg C/l)
Keinotekoinen makea vesi	-	-	Steriili	-	-
Vesijärvi	61.0448	25.5854	Kirkas	Kesä	6,3
Haukijärvi	61.2229	25.1386	Humus	Syksy	15,9

2.2 Tutkimuksen alustaminen

Tutkimuksessa käytettiin steriloituja lasipulloja (tilavuus 250 ml) koepulloina. Tutkimus aloitettiin inkuboinnilla eli koevesien säilyttämisellä koepulloissa valvotuissa olosuhteissa. Laminaarissa lasisella puhtaalla mittalasilla mitattiin 200 ml Haukijärven vettä (humus) kuuteen, 200 ml Vesijärven vettä (kirkas) kuuteen ja 250 ml keinotekoista makeaa vettä (keinotekoinen) kuuteen lasipulloon. Pullojen päälle laitettiin foliopalat vesien lisäyksen jälkeen.

Kun vedet olivat olleet inkuboitumassa noin yhden kuukauden huoneenlämmössä, ja vesissä olevat mikrobistot olivat vakiintuneet, vedet haettiin jatkokäsittelyjä varten. Vetokaapissa yhdistettiin aina saman koeveden 6 pulloa kokoomänäytteeksi isoon erlenmeyer-pulloon, josta vesi siirrettiin steriloituun muovipulloon. Seuraavaksi jokaista koevettä siirrettiin lopullisen koetilavuuden (150 ml) verran takaisin kuuteen lasipulloon.

Mikromuovia (polyeteeni-¹³C₂, Sigma-Aldrich) punnittiin mikrovaa'alla (Mettler Toledo, AT21 Comparator) mahdollisimman tarkasti noin 2 mg jokaisen käsittelyn neljään pulloon (kaksi kontrollia/koevesi). Tinakuppi (Elemental Microanalysis, DI008, tin capsules pressed, standard weight 8 x 5 mm, UK), jolla PE-mikromuovi punnitaan, punnittiin sekä PE-mikromuovin kanssa, että sen lisäämisen jälkeen, koska kaikkea punnittua PE-mikromuovia ei saanut siirrettyä kupin reunoilta

koepulloon. Nämä määrät kirjattiin ylös, jotta lopullinen, pulloon päätynyt määrä PE-mikromuovia voitiin selvittää määrien erotuksella toisistaan. Kun PE-mikromuovi oli lisätty neljään pulloon jokaisesta kolmesta koevedestä (12 pulloa), kaikki 18 pulloa vietiin kasvatushuoneeseen jatkuvaan ravisteluun (huoneenlämpö, Heidolph Unimax-ravistelija 2010, 113 rpm). Koepulloja inkuboitiin pimeässä kasvatushuoneessa 8 viikon ajan.

2.3 Kaasumittaukset

Joka viikko kahdeksan viikon ajan suoritettiin kaasumittaukset jokaisesta vesinäytepullosta puhtaisiin, heliumilla täytettyihin exetainer-putkiin neulan ja ruiskun avulla. Jokaisesta pullosta siirrettiin viikoittain 5 ml kaasua uusiin nimettyihin putkiin, jotka analysoitiin myöhemmin. Kaasumittauksen tuloksista voitiin selvittää, kuinka näytteet olivat leimaantuneet PE-mikromuovin ¹³C:llä tutkimuksen aikana. Putkista siirrettiin ennen kaasun lisäämistä ylipaine pois neulalla. Vesinäytepulloihin lisättiin kahdesti tutkimuksen aikana tyypeä niin paljon kuin niistä oli otettu, jotta pulloihin ei aiheudu suurta alipainetta viikoittaisilla mittauksilla.

Tutkimuksen lopussa kahdeksannella viikolla otettiin lisäksi nestenäytteet jokaisesta järvivesipullosta. Nestenäytteitä otettiin ruiskun ja neulan avulla 3 ml jokaisesta pullosta ja siirrettiin heliumilla täytettyihin exetainer-putkiin. Vesinäytteisiin lisättiin heti 0,2 ml fosforihappoa, jotta saatiin epäorgaaninen hiili höyrystettyä hiilidioksidiksi.

Järvivesinäytteiden happipitoisuutta seurattiin lisäksi viikoittain happipitoisuusmittauksilla, jotka suoritettiin jokaiselle käsittelylle (näytepulloista M1, C1, H1). Mittaukseen käytetään PreSens Microx 4 trace -mittalaitetta (Precision Sensing GmbH, Saksa, Regensburg, asetuksissa mode: dry, sensor: Needle 2). Jokainen happimittaus suoritettiin kolmesti, ja näistä tuloksista otettiin keskiarvo kullekin käsittelylle.

2.3.1 Kaasu- ja nestenäytteiden analysointi kaasukromatografilla

Kaasukromatografia käytetään haihtuvien yhdisteiden erotteluun, ja sen erottelu perustuu molekyylien vuorovaikutukseen liikkuvassa ja pysyvässä faasissa. Tutkimuksessa otetuista kaasu- ja nestenäytteistä haluttiin selvittää hiilen pitoisuus, jotta mineralisoituneen hiilen määrän voitaisiin myöhemmin laskea. Kahdeksan viikon aikana otetut kaasunäytteet sekä viimeisellä viikolla otetut nestenäytteet siirrettiin kaasukromatografiin analysoitavaksi (Agilent Technologies 7890B GC System + CTC Analytics PAL System, Exetray 1, 1-50, Metodi: GC-HPL, Front Detector: Air Flow; 350.0, Makeup (N₂): 2.000). Nestenäytteisiin lisättiin ennen analysointia 2 ml typpeä (3 ml nestettä, 2 ml typpeä, yht. 5 ml), jotta kaasukromatografi pystyi ajamaan näytteet (minimitilavuus 5 ml). Nestenäytteistä keinotekoisien koeveden ja humuspitoisen koeveden näytteet ajettiin "Low"-metodilla ja kirkasvetisen koeveden näytteet ajettiin "High"-metodilla, koska niistä oletettiin löytyvän suuri määrä mikrobeja. Kaasukromatografian tulokset siirtyivät suoraan tietokoneelle, josta tuloksia pääsi jatkokäsittämään.

2.3.2 Kaasu- ja nestenäytteiden isotoopit (GC-IRMS)

Kaasukromatografi-isotooppi-massaspektrometria on massaspektrometrian erityisala, jossa massaspektrometrian menetelmiä käytetään mittamaan isotooppien suhteellista määrää näytteessä. Kun kaasu- ja nestenäytteet oli käsitelty kaasukromatografilla, niistä analysoitiin vielä isotoopit. Ajoa varten valmisteltiin standardiputket puhdistamalla exetainer-putkia heliumilla, ja jättämällä putkiin lopuksi tyhjiö. Putket täytettiin ruiskun avulla halutulla määrällä standardikaasua (1, 3, 6 tai 12 ml, jokaista useampi putki). Osa putkista täytettiin pelkällä heliumilla. Ajoa varten valmisteltiin myös kalkkikivi-putket, jotka aseteltiin ajoon standardien jälkeen. Kalkkikivi-putkia varten punnittiin tinakuppi analyysivaa'alla (Mettler Toledo, AT21 Comparator), lisättiin 0,1 mg kalkkikiveä (DIC Std. 1, CaCl₂, $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -24 \cdot 23$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}} = 16 \cdot 67$) ja kaadettiin sisältö tyhjään putkeen. Putkeen asetettiin korkki, täytettiin heliumilla, ja sinne lisättiin lopuksi ruiskulla 0,2 ml fosforihappoa. Hiilidioksidin hiilen isotooppien suhde määritettiin isotooppimassaspektrometrin (IsoPrimer, Elementar Analysis) avulla ja kaasunäyte konsentroidtiin ensin käyttäen esikonsentraattoria (TraceGas, IsoPrime, Elementar

Analysis). Jokaisen erillisen ajon alussa olivat standardit, joiden avulla näytteiden tulokset korjattiin.

Nestenäytteiden GC-TCD-arvot olivat kaasukromatografian tulosten perusteella liian suuria, joten näytteitä täytyi laimentaa. Tuloksissa pyrittiin noin 1000 ppm (TCD), joten putken tilavuus (12 ml) jaettiin jokaisella nestenäytteen TCD-tuloksella, jolloin vastaukseksi saatiin haluttu määrä näytettä. Tämä laskettu määrä kunkin näytteen kaasutilasta siirrettiin ruiskun avulla puhtaaseen putkeen, joka lopuksi täytettiin heliumilla.

2.3.3 Aineiston käsittely

Kaasunäytteiden hiilen (CO₂) pitoisuus koepullossa c_{kaasu} selvitettiin seuraavalla yhtälöllä

$$c_{kaasu} = \left(\left(\lambda * \frac{V_{putki+näyte}}{V_{putki}} * M_C \right) / V_m \right) * \left(\frac{T_0}{T_{RT}} \right) * V_{kaasutila}, \quad (1)$$

jossa λ on GC-TCD_amount -tulos (lämmönjohtavuus), $V_{putki+näyte}$ on exetainer-putken tilavuus kaasunäytteen kanssa, V_{putki} on exetainer-putken tilavuus, M_C on hiilen moolimassa, V_m on standardimoolitilavuus, T_0 on lämpötila (0 °C), T_{RT} on lämpötila (huoneenlämpö) ja $V_{kaasutila}$ on kaasun tilavuus koepullossa.

Nestenäytteiden hiilidioksidipitoisuus koepullossa c_{neste} saatiin selville kaasukromatografista saatujen GC-FID_CO2_area -tulosten eli liekin ionisaation, tai GC-TCD_area -tulosten (pinta-ala) avulla yhtälöllä

$$c_{neste} = \left((a_{CO2}/k) / V_{näyte} \right) * V_{nestetila}, \quad (2)$$

jossa a_{CO2} on GC-FID- tai GC-TCD -tulos pinta-alana ilmaistuna, k on kulmakerroin, $V_{näyte}$ on näytteen tilavuus ja $V_{nestetila}$ on nesteen tilavuus koepullossa.

Ainoastaan keinotekoisien koeveden ja humuspitoisen koeveden näytteet ajettiin kaasukromatografissa "Low"-metodilla, jolloin niille saatiin GC-FID_area -tulokset. "High"-metodilla ajetuille, oletettavasti korkeita pitoisuuksia sisältäville kirkkaan koeveden näytteille saatiin vain GC-TCD_area -tulokset. Molempien metodien tuloksille selvitetiin kulmakertoimet standardien kalibrointisuorien avulla. Standardina käytettiin natriumkarbonaattia, josta valmistetuista näytteistä selvitetiin GC-FID- tai GC-TCD -pinta-alat, ja jotka asetettiin suoralle ($x = \text{FID/TCD pinta-ala}$, $y = \text{hiilen osuus}$). Hiilen osuus standardinäytteistä selvitetiin kertomalla standardinäytteen massa hiilen kokonaisuudella natriumkarbonaatin moolimassasta.

Isotooppianalyysin (GC-IRMS) avulla saatiin selvitettyä kaasu- ja nestenäytteille $\delta^{13}\text{C}$ -arvo, joka on vakaiden isotooppien ^{13}C ja ^{12}C suhdeluku (promilleina). Isotooppi ^{13}C rikastuminen (Δ) laskettiin käsittelyjen ja kontrollien välillä (käsittelykontrollit), jolloin positiiviset arvot (‰) merkitsivät sitä, että ^{13}C -polyeteeniä käytettiin hyödyksi (näytteet olivat leimaantuneet). Mitä enemmän isotooppitulokset olivat positiivisia, sitä enemmän näytteistä löytyi raskasta ^{13}C :tä.

$\delta^{13}\text{C}$ -arvojen avulla selvitetiin atomiprosentit AP jokaiselle näytteelle yhtälöllä

$$AP = ((\delta^{13}\text{C} + 1000)/((\delta^{13}\text{C} + 1000) + (1000/R_{\text{standard}}))) * 100\%, \quad (3)$$

jossa R_{standard} on 0,01118 (VPDB, laskettu NBS-19:ä) (IAEA-TECDOC-825, Zhang ym. 1987).

Seuraavaksi laskettiin hiilen hajoaminen, eli näytteissä olevan hiilidioksidin ^{13}C :n prosentuaalinen osuus. Tämä prosentuaalinen arvo kertoo, kuinka paljon näytteissä ollut ^{13}C oli mineralisoitunut, eli muuttunut uloshengitetyksi hiilidioksidiksi, kahdeksassa viikossa. Käytettiin yhtälöä

$$r_{13C/CO_2} = (\Delta AP * c_{CO_2} / m_{MP} * C\%_{MP}) * 100\%,$$

(4)

jossa ΔAP on käsittelyn ja kontrollien keskiarvojen erotus atomiprosentteina, c_{CO_2} on hiilidioksidin pitoisuus koepullossa, m_{MP} on alkuperäinen punnittu ja koepulloihin siirretty PE-mikromuovin massa ja $C\%_{MP}$ on hiilen osuus PE-mikromuovissa (moolimassojen suhde C_2/C_2H_4).

2.4 Mikrobiyhteisöiden rakenne ja biomassa

Kuhunkin järvidesipulloon jätettiin noin 60 ml nestettä muita tutkimuksia varten, ja kaadettiin loppu leimattuja näytteitä kestävään mittalasiin. Se määrä, mitä vedestä jäi jäljelle mittalasiin, kirjattiin ylös ja suodatettiin uuden punnitun suodatinpaperin (Whatman, cellulose nitrate membrane filters, 0,2 μm , 47 halkaisija) läpi erillisen suodatusjärjestelmän avulla (suppilo, sintteri, kartiomainen lasipullo, vakuumpumppu VWR, vakuumpumpun letku ja kiristin). Varsinaisessa kokeessa käytettävien näytteiden lisäksi tehtiin kaksi kontrollia, jotka valmistettiin suodattamalla punnitulle suodatinpaperille ultrapuhdasta vettä. Suodatinpaperit siirrettiin petri-maljoille ja niihin kirjoitettiin, mistä vesinäytteestä oli kyse, ja mikä suodatinpaperin alkuperäinen paino oli. Maljat vietiin pakastimeen (-80 °C) odottamaan jatkokäsittelyä.

Suodatinpaperit haettiin pakastimesta, ja siirrettiin kylmäkuivaukseen (B. Braun Biotech International, Christ, Alpha 2-4, vacuum mbar: 25.00) noin päiväksi. Kun näytteet olivat olleet riittävän kauan kylmäkuivauksessa petri-maljoineen, ne haettiin takaisin punnitushuoneeseen, ja punnittiin jälleen analyysivaa'alla. Nykyinen paino kirjattiin ylös, jotta alku- ja loppupainojen erotus voitiin laskea. Näytteet siirrettiin takaisin pakastimeen (-80 °C).

Kimax-putkia valmisteltiin tulevia analyysijä varten valmiiksi. Aluksi putkille oli suoritettu konepesu, jonka jälkeen ne olivat olleet päivän 450 °C uunissa. Tämän jälkeen vetokaapissa lisättiin 1 ml kloroformi:MeOH (2:1) -seosta jokaiseen putkeen,

kiinnitettiin korkki ja ravisteltiin hyvin. Neste kaadettiin ulos, ja putket asetettiin telineeseen kuivumaan.

2.4.1 Lipidien uutto

Näytteet haettiin pakastimesta, ja vetokaapissa rullattiin varovasti hanskat kädessä jokainen suodatinpaperi edellispäivänä puhdistettuihin Kimax-putkiin. Kun näyte oli putkessa, lisättiin putkeen 3 ml kloroformi:MeOH (2:1) -seosta, ja ravisteltiin putken sisältö asettamalla putki muutamaksi sekunniksi Vortex-ravistelijaan. Näin suodatinpaperi saatiin painumaan putken pohjaan. Tämän jälkeen putkeen lisättiin 750 µl ultrapuhdasta vettä ja sähköpipetillä 30 µl sisäistä standardia (Emma Pajunen 10.4.2019, FA/STER ISTD, PLFA 19:0 - 5,011 mg, 23:0 - 5,012 mg, 5 alfa-cholestane - 5,018 mg / 10 ml kloroformi). Jälleen putki käytettiin Vortex-ravistelijassa. Tämän jälkeen näytteet laitettiin sonikaattoriin 10 minuutiksi (VWR Ultrasonic Cleaner), jonka jälkeen ne käytettiin Vortex-ravistelijassa 5–10 sekunnin ajan. Seuraavaksi näytteet asetettiin sentrifugiin 4 minuutiksi (Megafuge 1.0 R Heraeus, 3000 rpm, 18 °C). Kun putken faasit erottuivat sentrifugissa, siirrettiin alafaasit uusiin merkittyihin putkiin lasisella pasteur-pipetillä. Uudet putket haihdutettiin kuiviksi typpihaihduttimella vetokaapissa (N-EVAP III, OA-SYS Organomation Associates inc. USA) käyttäen rikastettuja neulankärkiä. Kun putket olivat kuivat, putkiin lisättiin 300 µl kloroformia.

2.4.2 Fraktiointi

Seuraavaksi näytteille suoritettiin lipidien fraktiointi NLFA:n, glykolipideihin ja PLFA:n. Fraktiointi toteutettiin käyttämällä kiinteäfaasiuuttoa eli SPE - erotusmenetelmää (Solid Phase Extraction), joka erottelee näytteessä olevat lipidit toisistaan. Fraktioinnissa käytettiin spesifistä SPE-erottelujärjestelmää ja pumppua. Laitteessa käytettävät suppilot (Agilent Technologies, BondElut, Agilent Sample Prep Solutions, 500 mg) aktivoitiin aluksi kostuttamalla ne kloroformi:MeOH (1:1) -seoksella, jotta liuottimet varmasti läpäisevät suppilot (2 x 3 ml dekantterilasiiin). Näyte pipetoitiin lasisella pasteur-pipetillä suppiloon ja putkeen lisättiin 300 µl kloroformia (poltettu), joka myös siirrettiin suppiloon, jotta näyte saatiin mahdollisimman tarkasti siirrettyä. Näytteistä haluttiin ottaa talteen sekä sterolit

(jatkotutkimuksia varten) että fosfolipidirasvahapot (PLFA). Steroli-putket siirrettiin paikalleen suppiloiden alle (letku: BondElut, Agilent, Sample Prep Solutions, LRC-SI, 500 mg), ja suppiloon pipetoitiin kahdesti 3 ml kloroformia, jotta saatiin kerättyä sterolit talteen. Tämän jälkeen pipetoitiin kahdesti 3 ml asetonia, joka suodatettiin suoraan lasiseen dekantterilasiin (glykolipidejä ei haluttu talteen). Seuraavaksi siirrettiin PLFA-putket paikoilleen, ja pipetoitiin kolmesti 3 ml metanolia (MeOH) suppiloon. Näin saatiin talteen PLFA-näytteet. Kun halutut näytteet saatiin fraktioitua putkiin, näytteet vietiin pakastimeen (-20 °C).

2.4.3 Rasvahappojen metylointi

PLFA-näytteet haettiin pakastimesta, ja kuivatettiin typpihaihduttimella kuiviksi. Putkiin lisättiin 1 ml tolueenia ja 2 ml H₂SO₄/MeOH (1 %). Näytteet huuhdeltiin nopeasti (5'') typpihaihduttimella, ja niihin asetettiin korkit paikalleen. Näytteet asetettiin rekissä lämpöhauteeseen (50 °C, MGW Lauda RC 20) yön ajaksi. Lämpöhauteessa inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin 2 ml tislattua vettä ja 2 ml heksaania. Näytteet käytettiin Vortex-ravistelijassa, ja asetettiin sentrifugiin (Heraeus Biofuge Primo, 5 min, 2500 rpm). Kun nestefaasit erottuivat, ylempi faasi siirrettiin uuteen putkeen lasisella pasteur-pipetillä. Näytteet haihdutettiin kuiviksi typpihaihduttimella. Näytteisiin lisättiin 300 µl heksaania, ja ne käytettiin varovasti Vortex-ravistelijassa. Neste siirrettiin sitten GC-vialeihin. Edellinen vaihe toistettiin vielä kerran, jolloin vialin lopullinen tilavuus oli 600 µl. Näin näyte saatiin mahdollisimman hyvin vialiin. Näytteet kuivatettiin typpihaihduttimella, ja lopuksi vialeihin lisättiin 100 µl heksaania. Näytteet vietiin ajoon kaasukromatografi-massaspektrometriin.

2.4.4 Rasvahappojen analysointi GC-massaspektrometrillä

Kaasukromatografi-massaspektrometria on analyttinen menetelmä, jota käytetään tunnistamaan eri aineita näytteestä. PLFA-näytteet asetettiin laitteeseen, joka koostui kolmesta eri komponentista (massaspektrometri eli detektor: Shimadzu GCMS-QP 2010 Ultra, kaasukromatografi eli erottelija: Shimadzu GC-2010 Plus, injektor: Shimadzu AOC-20i Auto Injector). Näytteiden loppuun sijoitettiin standardit (566C 15, 50, 100, 250 ng/µl) ja DHA + EPA (10 ng/µl, 31.7.18,

Emma&Mervi). Kolonnina käytettiin ZB-Fame Zebron Capillary GC Column (Phenomenex, 30 m, 0,25 mm). Injektori-neulan pesussa käytettiin tolueenia, asetonia ja heksaania. GC-kolonnin lämpötilaohjelma alkoi 50 °C, ja sitä pidettiin 1 minuutin ajan 50 °C, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin 10 °C/ minuutissa 130 °C asti, ja sen jälkeen 7 °C/ minuutissa 180 °C asti, ja vielä 2 °C/ minuutissa 200 °C asti, jossa sitä pidettiin 3 minuutin ajan. Lopulta lämpötila nostettiin 10 °C/ minuutissa lämpötilaan 260 °C. Ajon kokonaiskesto oli 35,14 minuuttia. Injektorin lämpötilaa pidettiin 270 °C.

Tulokset siirtyivät suoraan tietokoneelle, jossa GCMS Browser -tietokoneohjelmalla tuloksia pääsi käsittelemään. Tuloksista tuli tarkistaa jokainen rasvahappopiikki sen retentioajan perusteella, ja suorittaa piikille integraatio (manual peak integration). Jokaisen näytteen rasvahappojen pitoisuudet ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) otettiin talteen.

2.4.5 Rasvahappojen hiilen isotooppien määrittäminen

Rasvahappojen $\delta^{13}\text{C}$ -arvot määritettiin käyttämällä GC-C-TA III -laitetta, joka oli yhdistetty isotooppimassaspektrometriin (IRMS, DELTAPLUSXP, Thermo Co.) Itä-Suomen yliopiston ympäristötieteiden osastolla Kuopiossa. Rasvahapot eroteltiin käyttämällä 30 m DB-23 -kolonnia (0,25 mm x 0,15 mm), jonka jälkeen rasvahapot hapetettiin hiilidioksidiksi hapetusreaktorissa 940 °C (pelkistysreaktori pidettiin 630 °C). GC-kolonnin lämpötilaohjelma alkoi 50 °C, ja sitä pidettiin 1 minuutin ajan 50 °C, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin 30 °C/ minuutti 140 °C asti, ja sen jälkeen 1 °C/ minuutissa 220 °C asti, ja lopulta lämpötilaa nostettiin 15 °C/ minuutissa 300 °C asti. Ajon kokonaiskesto oli 94,3 minuuttia. Injektorin lämpötilaa pidettiin 270 °C. Näytteet ajettiin sisäistä standardia vastaan, > 99 % heksadekaanihappometyyliesteri $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$, Indiana University, Arndt Schimmelmann), jonka $\delta^{13}\text{C}$ -arvot olivat -30,74 ‰. Standardia käytettiin liukuman ja lineaarisuuden korjaukseen.

2.4.6 Aineiston käsittely

Haluttiin selvittää PE-mikromuovin hiilen assimiloituminen mikrobien biomassaan kahdeksassa viikossa. PLFA-näytteiden rasvahappopitoisuuksista vähennettiin

taustan vaikutus, jotta varsinaiset näytteiden pitoisuudet ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) saatiin selvitettyä. Saanto (%) R laskettiin ensin käyttämällä hyödyksi sisäisenä standardina lisättyä rasvahappoa 19:0 yhtälöllä

$$R (\%) = \frac{c_{FA \text{ mitattu}}}{c_{FA \text{ teoreettinen}}} * 100\%, \quad (5)$$

jossa $c_{FA \text{ mitattu}}$ on sisäisen standardin (19:0) pitoisuus näytteessä ja $c_{FA \text{ teoreettinen}}$ on standardin teoreettinen pitoisuus.

Rasvahapon massa näytteen kuivapainoa kohti laskettiin yhtälöllä

$$r_{FA} = \frac{c_{FA} * V_{ajo}}{m_{näyte}} * 1/R, \quad (6)$$

jossa c_{FA} on rasvahapon pitoisuus ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) näytteessä perustuen standardien kalibroitisuoriin (566C), V_{ajo} on näytteen ajotilavuus (μl), $m_{näyte}$ on suodatuksen jälkeen jääneen näytteen massa (mg) ja R on sisäisen standardin saanto (osuutena). Tausta-kontrollien (ultrapuhdas vesi) suodatinpaperien alku- ja loppupainon erotuksien keskiarvo (mg) lisättiin varsinaisten näytteiden painoihin, jotta saatiin todelliset näytteiden massat selville.

Lopuksi tulos jaettiin 0,5 eli hiilen osuudella näytteessä (näytteiden hiiliprosentiksi oletettiin 50 % aikaisempien tutkimuksien perusteella).

Hiilen assimiloituminen mikrobien biomassaan saatiin ratkaistua yhtälöiden (7)–(9) avulla. Ensin käsitellyt isotooppianalyysin tulokset ($\delta^{13}\text{C}$) muunnettiin atomiprosenteiksi yhtälön (3) mukaisesti. Tämän jälkeen kunkin veden (keinotekoinen, kirkas, humus) kontrollinäytteiden ($n = 2$) atomiprosenteista otettiin keskiarvo \overline{AP}_{kontr} (esim. kirkasvetinen koevesi $(AP_{Kirkas\ 5} + AP_{Kirkas\ 6})/2$). Näytteen rikastuminen ^{13}C -hiilellä laskettiin PE-mikromuovilla rikastetun näytteen $AP_{käs}$ ja kontrollien keskiarvon atomiprosenttien erotuksena

$$\Delta AP = AP_{käs} - \overline{AP}_{kontr} \quad (7)$$

Seuraavaksi haluttiin selvittää prosentuaalinen PE-mikromuovin osuus kaikesta hiilestä kussakin rasvahapossa. Tätä varten laskettiin ensin näytteistä löytyneiden rasvahappojen hiilen prosentuaaliset osuudet $C\%_{FA}$ yhtälöllä

$$C\%_{FA} = (N_C * M_C) / M_{FA}, \quad (8)$$

jossa N_C on kyseisen rasvahapon hiiliatomien lukumäärä, M_C on hiilen moolimassa 12,01 g/mol ja M_{FA} on kyseisen rasvahapon atomien yhteenlaskettu moolimassa. Esimerkiksi rasvahapolle 16:0 (palmitiinihappo, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) laskukaava olisi seuraava

$$C\%_{FA\ 16:0} = (16 * 12,01 \frac{g}{mol}) / 256,43 \frac{g}{mol}.$$

PE-mikromuovin prosentuaalinen osuus kaikesta hiilestä rasvahapossa $MP\%_{C\ in\ FA}$ saatiin selvitettyä yhtälöllä

$$MP\%_{C\ in\ FA} = (C\%_{FA} * \Delta AP * r_{FA}) / (C\%_{FA} * r_{FA}) * 100\%. \quad (9)$$

Jotta tulokset voitiin suhteuttaa kokeissa käytettyihin vesimääriin, ja selvittää mikrobien biomassaan assimiloituneen ^{13}C :n määrä, koko alkuperäisen koepullon veden tilavuus jaettiin suodatinpaperien läpi suodatetulla veden tilavuudella. Näin saadulla kertoimella kerrottiin yhtälön (6) tulokset r_{FA} ja selvitettiin C_{total} , eli kuinka suuri osuus rasvahapoista oli hiiltä koko näytepullossa, yhtälöllä

$$C_{total} = \left(\frac{V_{koepullo}}{V_{suodatettu}} \right) * r_{FA}. \quad (10)$$

Leimatun hiilen eli ^{13}C :n osuus rasvahappojen hiilestä $r_{13\text{C}}$ johdettiin edellisistä tuloksista yhtälöllä

$$r_{13\text{C}} = (MP\%_{\text{C in FA}}/100\%) * C_{\text{total}}. \quad (11)$$

Kun näytteen jokaisen rasvahapon $r_{13\text{C}}$ -tulokset summattiin yhteen, saatiin selville koko näytteen ^{13}C :n osuus rasvahappojen hiilestä. Tämä tulos kerrottiin kertoimella 20 (5% bakteerien hiilestä on fosfolipidien rasvahapoissa) ja näin selvitettiin ^{13}C :n osuus mikrobeissa r_{mikrobit} .

Biomassaan assimiloitunut ^{13}C :n määrä saatiin selvitettyä lopulta yhtälöllä

$$r_{13\text{C}/\text{biomassa}} = (r_{\text{mikrobit}}/m_{\text{MP}}) * 100\%. \quad (12)$$

Yhtälöillä (4) ja (12) saaduilla tuloksilla oli mahdollista laskea arvio PE-mikromuovin hiilen 100% hajoamiselle vuosissa $a_{100\%}$ (mineralisaatio_{kaasu+neste} + assimiloituminen biomassaan) jokaiselle koevedelle yhtälöllä

$$a_{100\%} = 100\% / (((r_{13\text{C}/\text{CO}_2} + r_{13\text{C}/\text{biomassa}}) / 2) * 12). \quad (13)$$

2.5 Koko aineiston tilastollinen testaus

Aineisto analysoitiin IBM SPSS Statistics -tilastoanalyysiohjelmalla (versio 26.0). Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona käytettiin p-arvoa 0,050. Aineiston normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilk -testillä, ja varianssien yhtäsuuruudet Levenen testillä. Haluttiin testata, eroavatko kahden tai useamman koeveden tulokset tilastollisesti merkitsevästi toisistaan, ja jos näin on, mikä/mitkä koevesistä ovat toisista poikkeavia. Testaukseen käytettiin yksisuuntaista varianssianalyysiä (one-way-ANOVA) ja Post-Hoc -testausta (Bonferroni).

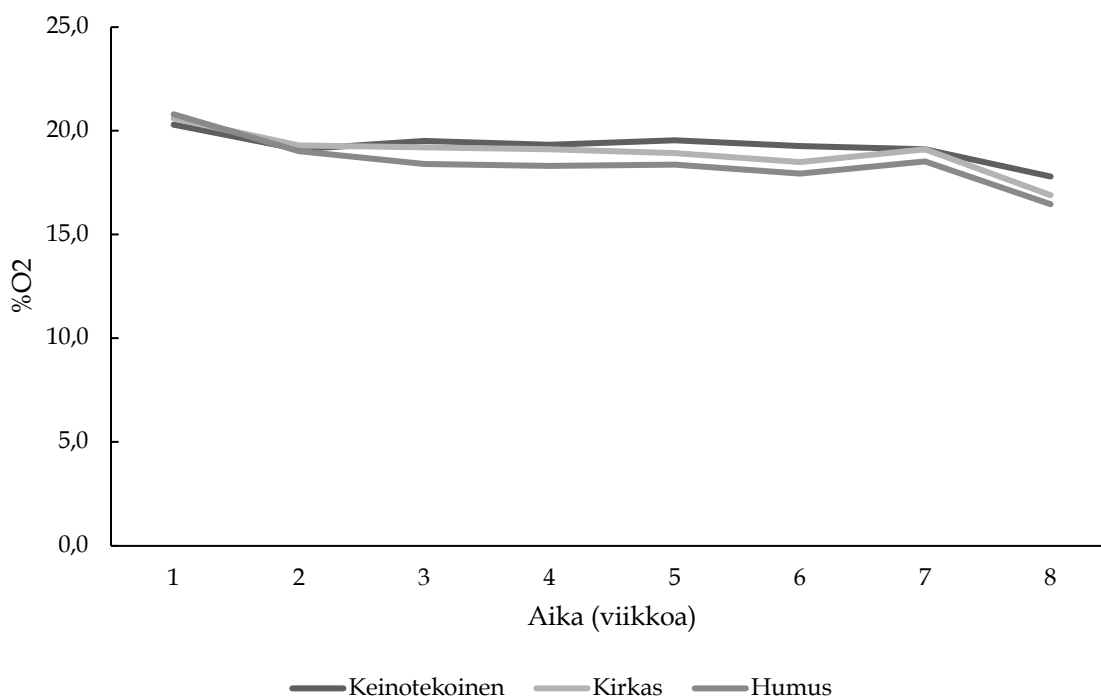
Aineiston homoskedastiset ominaisuudet eivät täyttyneet jokaisen muuttujan kohdalla, joten ei-normaalijakautuneelle ja/tai ei-yhtäsuuret varianssit omaavalle aineistolle suoritettiin Kruskal-Wallisin testi ja siihen liittyvät parittaiset monivertailut (Bonferroni-korjauksella) tai Welch ANOVA -testi ja Games Howelin Post-Hoc - testi.

Selitettävänä muuttujina aineistossa olivat koevesien kaasu- ja nestenäytteiden leimaantuminen (‰) PE-mikromuovin hiilellä, PE-mikromuovin hiilen mineralisoituminen (%), PE-mikromuovin hiilen assimiloituminen mikrobien biomassaan (%), PE-mikromuovin hiilen mineralisoituminen ja uuden biomassan rakentamisen summa (%), PE-mikromuovin kokonaishajoaminen (vuosissa) ja näytteistä löytyneiden rasvahappojen perusteella muodostettujen rasvahapporyhmien (SAFA, MUFA, BrFA, LIN) leimaantuminen (‰) PE-mikromuovin hiilellä. PE-mikromuovin kokonaishajoamisen (vuosissa) riippuvuutta gram-negatiivisille bakteereille tyypillisestä rasvahaposta (PLFA_{18:1w7}) tarkasteltiin lisäksi regressioanalyysin avulla.

3 TULOKSET

3.1 Kaasumittaukset

Kokeeni alussa happipitoisuus (%O₂) pulloissa vaihteli 20–21 % välillä eri käsittelyissä (keinotekoinen, kirkas, humus). Vaihtelu oli suurinta humuspitoisessa vedessä (muutos ensimmäisen ja viimeisen viikon välillä: -4,3 %O₂), mutta käsittelyt eivät eronneet toisistaan merkitsevästi (Kuva 2).

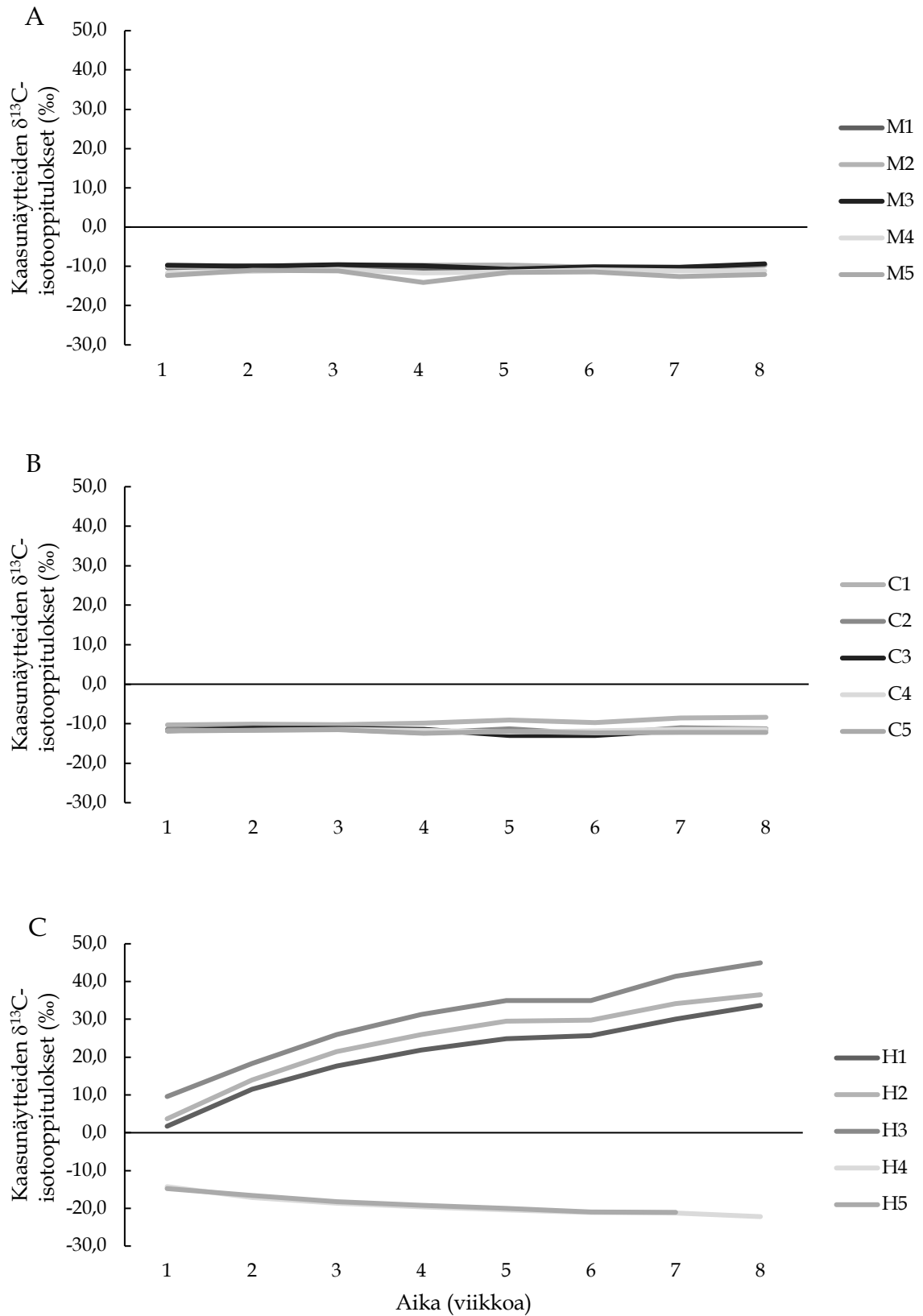


Kuva 2. Keinotekoisien, kirkkaan ja humuspitoisen koevesipullon (M1, C1, H1) happipitoisuuden (%O₂) muutokset kahdeksan viikon aikana.

3.1.1 Kaasunäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -tulokset

Jokaisen koeveden (keinotekoinen, kirkas, humus) käsittelyistä paljastui $\delta^{13}\text{C}$ -isotooppitulosten perusteella yksi kontaminoitunut näyte, joista jokainen poistettiin tulosten tarkastelusta jatkossa. Näin kontaminoituneet näytteet, jotka poikkesivat huomattavasti rinnakkaisista näytteistä, eivät vaikuta tuloksiin vääristävästi.

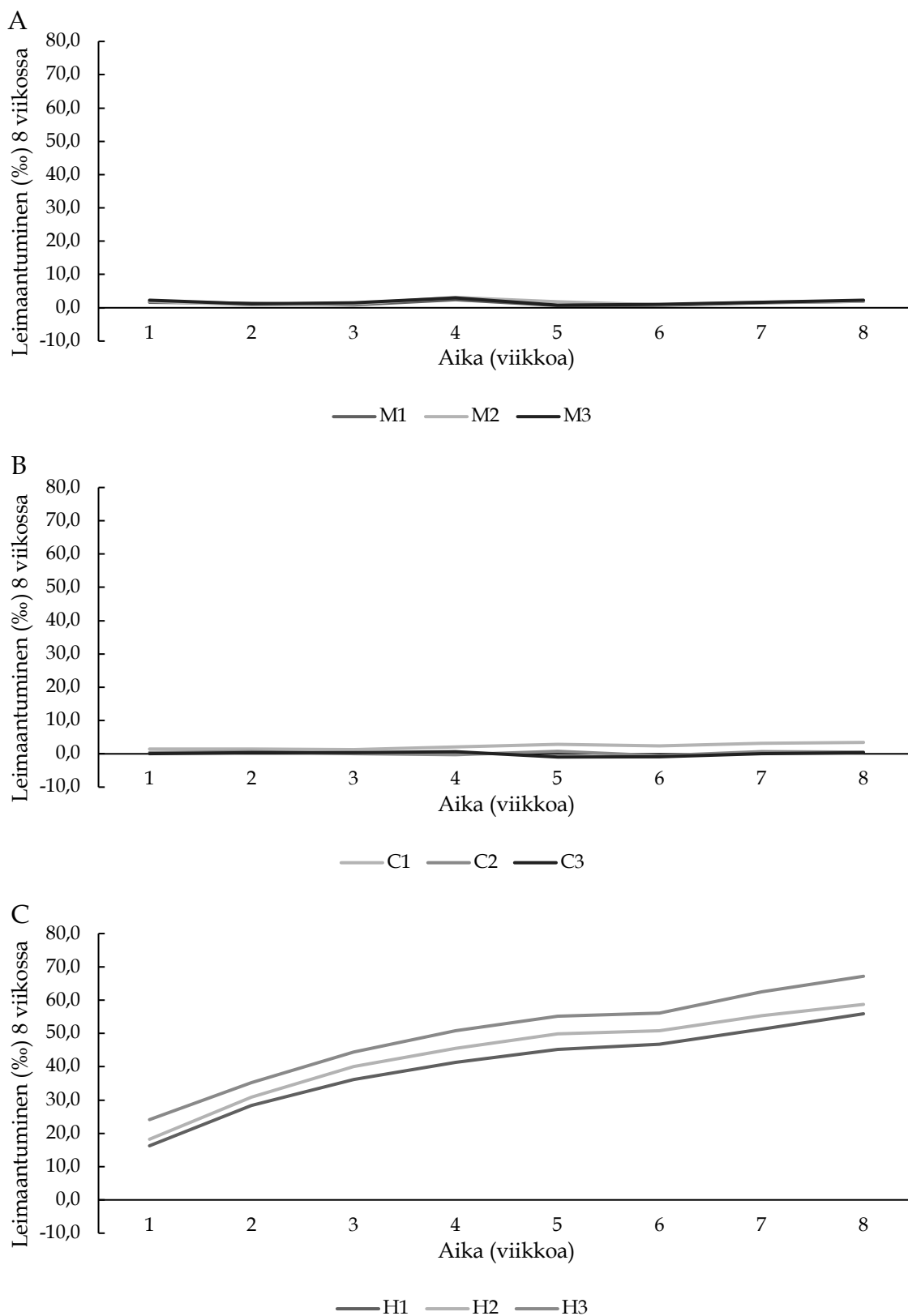
Sekä keinotekoisien että kirkasvetisen koeveden kaasunäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot olivat negatiivisia, eli näytteistä löytyi (sekä käsittelyissä että kontrolleissa) enemmän hiilen kevyempää isotooppia ^{12}C :tä suhteessa standardiin (Kuva 3A-B). Humuspitoisen veden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot olivat positiivisia käsittelyillä (n = 3) ja negatiivisia kontrollinäytteillä (n = 2) (Kuva 3C). PE-mikromuovilla rikastetuista näytteistä löytyi siis enemmän raskasta hiilen isotooppia ^{13}C :tä verrattuna humuspitoisen koeveden kontrolleihin tai toisiin koevesiin.



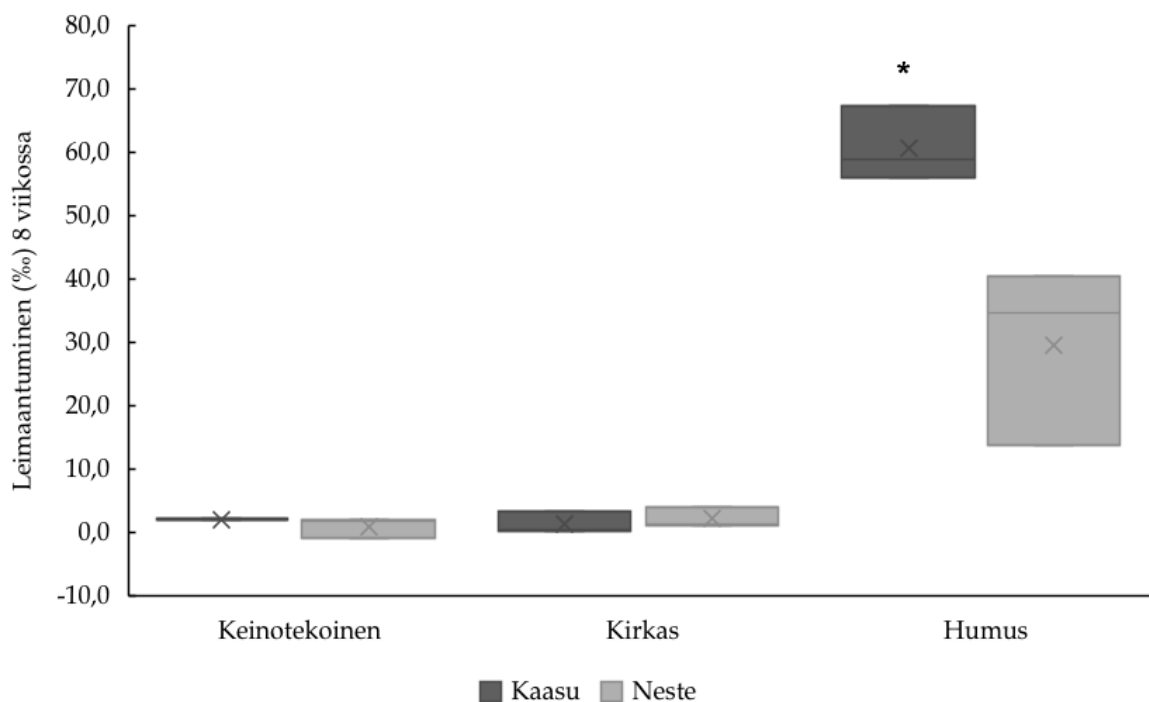
Kuva 3. Koevesien kaasunäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -isotooppitulokset promilleina (‰) kahdeksan viikon aikana. (A) Keinotekoinen koevesi, $n = 5$, M1-M3 = käsittelyt, M4-M5 = kontrollit. (B) Kirkas koevesi, $n = 5$, C1-C3 = käsittelyt, C4-C5 = kontrollit. (C) Humuspitoisen koevesi, $n = 5$, H1-H3 = käsittelyt, H4-H5 = kontrollit.

3.1.2 Kaasu- ja nestenäytteiden leimaantuminen PE-mikromuovin hiilellä

Tulokset lähellä 0-arvoa kertovat, että PE-mikromuovi ei ollut hajonnut lähes yhtään, tai vain hieman keinotekoisessa ja kirkkaassa koevedessä kaasu- ja nestenäytteiden osalta (Kuva 4A-B, Kuva 5). Humuspitoisessa koevedessä leimaantuminen oli selkeämmin havaittavissa (positiiviset arvot), sillä esimerkiksi kaasunäytteiden osalta käyrät kasvavat lähes eksponentiaalisesti (Kuva 4C, Kuva 5). Kaasunäytteiden leimaantumisessa havaittiinkin tilastollisesti merkitsevä ero koevesien väliltä (Welch ANOVA, $F_{2,2,7} = 120,036$, $p = 0,002$). Kaasunäytteiden osalta humuspitoinen koevesi erosi tilastollisesti merkitsevästi kirkkaasta (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,003$) sekä keinotekoisesta koevedestä (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,006$). Kirkas ja keinotekoinen koevesi eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Nestenäytteiden osalta leimaantumisessa ei löytynyt koevesien väliltä tilastollisesti merkitsevää eroa.



Kuva 4. Koevesien kaasunäytteiden leimaantuminen PE-mikromuovin hiilellä kahdeksassa viikossa. (A) Isotooppien erotus (Δ , käsittely-kontrolli, ‰) keinotekoisessa vedessä, $n = 3$. (B) Isotooppien erotus (Δ , käsittely-kontrolli, ‰) kirkkaassa vedessä, $n = 3$. (C) Isotooppien erotus (Δ , käsittely-kontrolli, ‰) humuspitoisessa vedessä, $n = 3$.



Kuva 5. Keinotekoisien, kirkkaan ja humuspitoisten koeveden leimaantuminen (%) PE-mikromuovin hiilellä kahdeksassa viikossa kaasunäytteiden (n = 3) ja nestenäytteiden (n = 3) perusteella. * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.

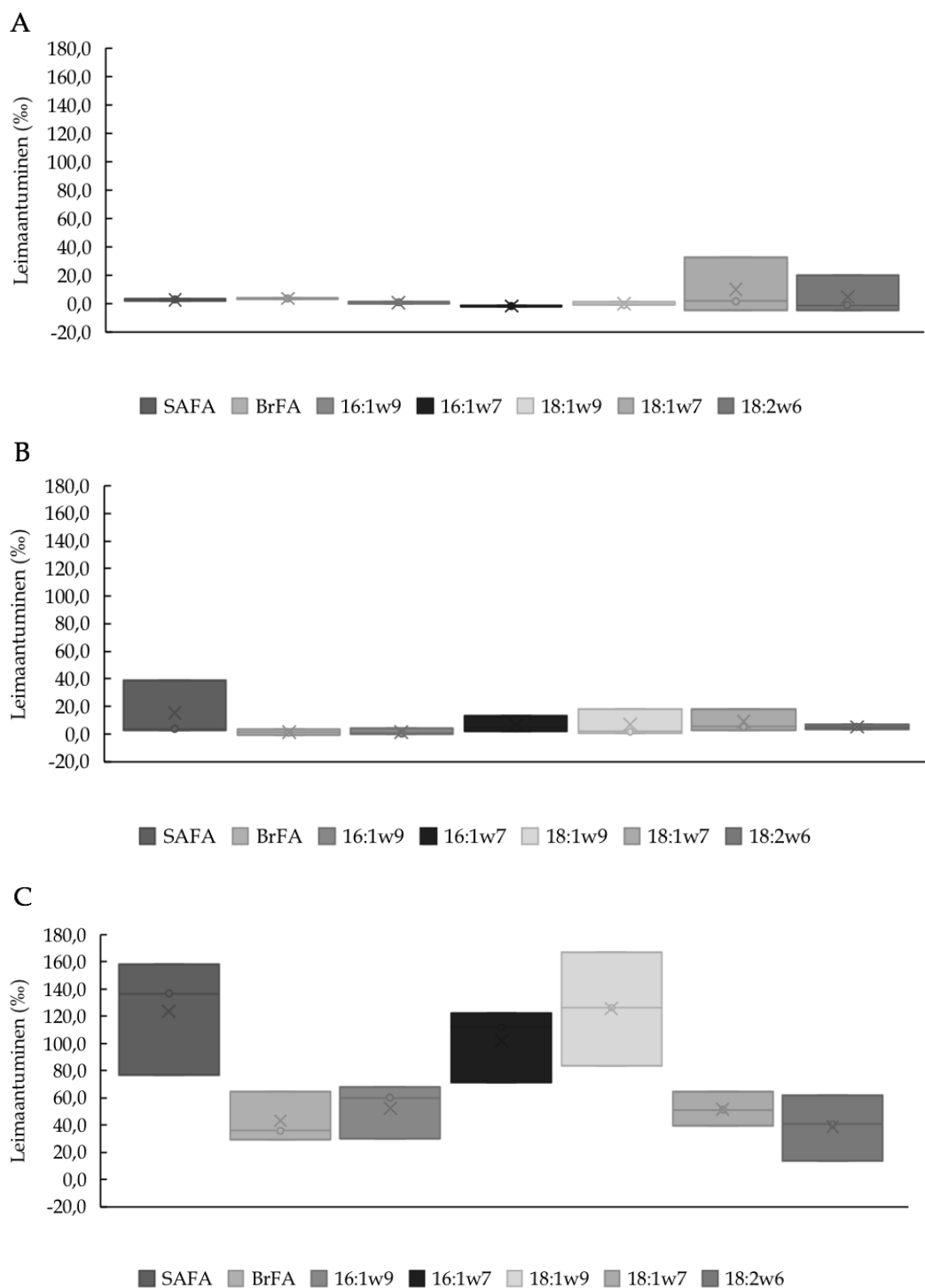
3.2 Mikrobyhteisöiden rakenne ja biomassa

3.2.1 Solukalvojen leimaantuminen PE-mikromuovin hiilellä

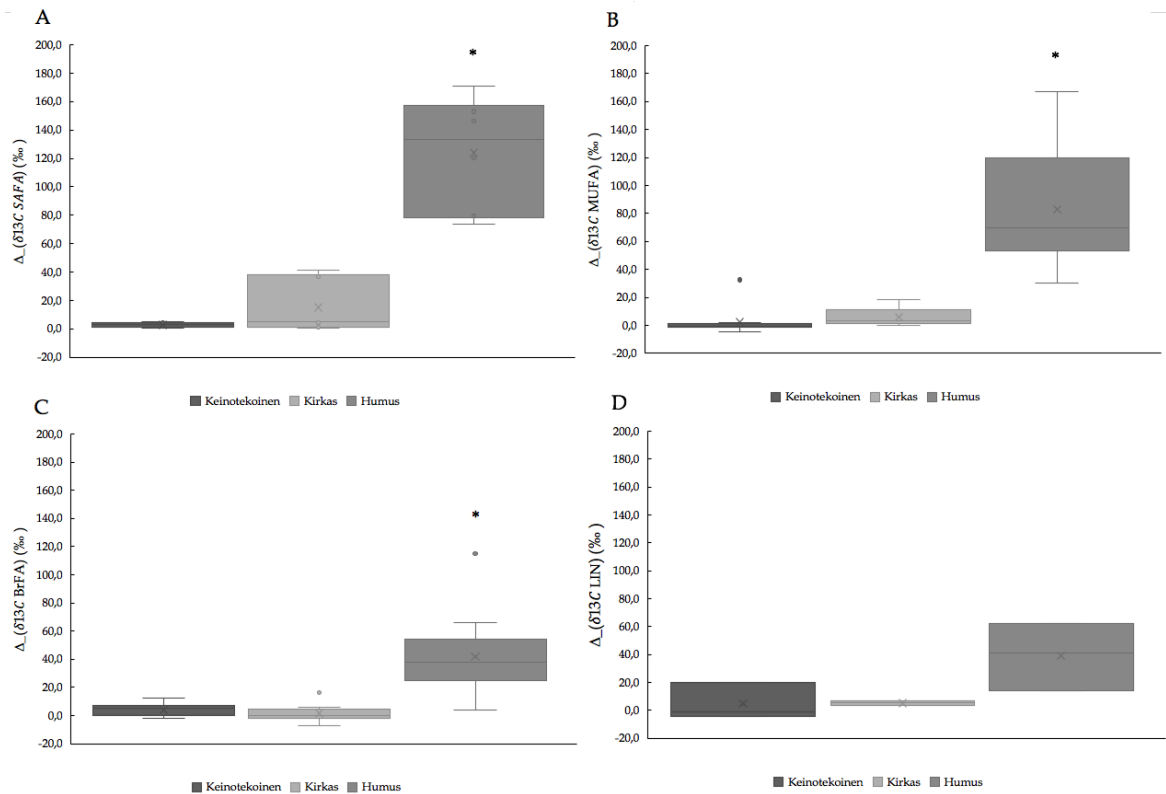
Vaihtelu näytteistä löytyneiden yksittäisten rasvahappojen ja niistä muodostettujen rasvahapporyhmien (Kuva 6) leimaantumisessa (%) PE-mikromuovin hiilellä oli tuloksien perusteella suurinta humuspitoisessa koevedessä, mutta kaiken kaikkiaan humuspitoisessa koevedessä rasvahapot olivat myös voimakkaimmin leimaantuneita.

Tilastollisesti merkitsevä ero (Welch ANOVA, $F_{2,6.7} = 26,120$, $p < 0,001$) leimaantuneissa tyydyttyneissä rasvahapoissa (SAFA; 15:0, 17:0) havaittiin sekä humuspitoisen ja kirkasvetisen (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,001$) että humuspitoisen ja keinotekoisien (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,002$) koeveden väliltä (Kuva 7). Yksittäistyydyttymättömien rasvahappojen osalta (MUFA;

16:1w7&9, 18:1w7&9) tulokset olivat hyvin samankaltaisia, sillä tilastollisesti merkitsevä ero (Kruskal-Wallis, $F = 25,384$, $df = 2$, $p < 0,001$) havaittiin sekä humuspitoisen ja keinotekoisien (Parittainen monivertailu, $p < 0,001$) että humuspitoisen ja kirkasvetisen (Parittainen monivertailu, $p = 0,001$) koeveden välillä. Myös kolmannen rasvahapporyhmän, haaroittuneiden rasvahappojen (BrFA; i14:0, i15:0, a15:0, i17:0, a17:0), leimaantumisessa löytyi tilastollisesti merkitsevä ero (Welch ANOVA, $F_{2,20.2} = 13,748$, $p < 0,001$) sekä humuspitoisen ja keinotekoisien (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,001$), että humuspitoisen ja kirkkaan (Games-Howell Post-Hoc, $p < 0,001$) koeveden väliltä. Minkään rasvahapporyhmän osalta keinotekoinen ja kirkasvetinen koevesi eivät eronneet toisistaan merkitsevästi. Linolihapon (LIN, 18:2w6) leimaantumisessa ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa koevesien väliltä.



Kuva 6. Rasvahappojen (tydyttyneet rasvahapot SAFA; 15:0, 17:0, haaroittuneet rasvahapot BrFA; i14:0, i15:0, a15:0, i17:0, a17:0, yksittäistyydyttymättömät rasvahapot MUFA; 16:1w7&9, 18:1w7&9, linolihapo LIN; 18:2w6) leimaantuminen (isotooppien erotus; Δ , käsittely-kontrolli, %) mikromuovin hiilellä kahdeksassa viikossa (A) Keinotekoisessa vedessä, n = 3. (B) Kirkkaassa vedessä, n = 3. (C) Humuspitoisessa vedessä, n = 3.



Kuva 7. Rasvahapporyhmien leimaantuminen mikromuovin hiilellä kahdeksassa viikossa keinotekoisessa ($n = 3$), kirkkaassa ($n = 3$) ja humuspitoisessa ($n = 3$) koevedessä: isotooppien erotus (Δ , käsittely-kontrolli, ‰). (A) Tyydyttyneet rasvahapot (SAFA; 15:0, 17:0), (B) Yksittäistyydyttymättömät rasvahapot (MUFA; 16:1w7&9, 18:1w7&9), (C) Haaroittuneet rasvahapot (BrFA; i14:0, i15:0, a15:0, i17:0, a17:0), (D) Linolihapo (LIN; 18:2w6). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.

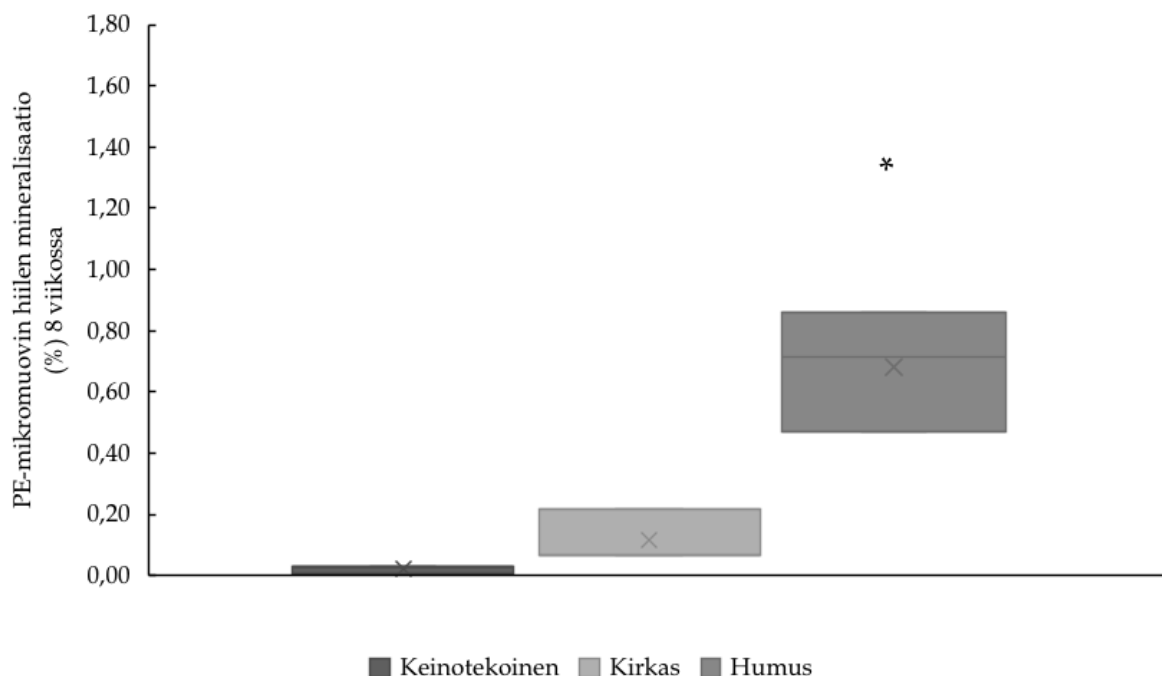
3.3 Mineralisaatio ja uuden biomassan rakentaminen

Kaikesta koevetteen lisäystä PE-mikromuovin hiilestä mineralisoitiin $0,02 \pm 0,01\%$ keinotekoisessa (ka. $n = 3$), $0,12 \pm 0,08\%$ kirkkaassa (ka. $n = 3$) ja $0,68 \pm 0,20\%$ humuspitoisessa (ka. $n = 3$) vedessä kahdeksan viikon aikana. Kaikesta koevetteen lisäystä PE-mikromuovin hiilestä assimiloitiin mikrobien biomassaan $0,04 \pm 0,04\%$ keinotekoisessa ($n = 3$), $0,18 \pm 0,22\%$ kirkkaassa ($n = 3$) ja $0,84 \pm 0,11\%$ humuspitoisessa ($n = 3$) vedessä kahdeksan viikon aikana.

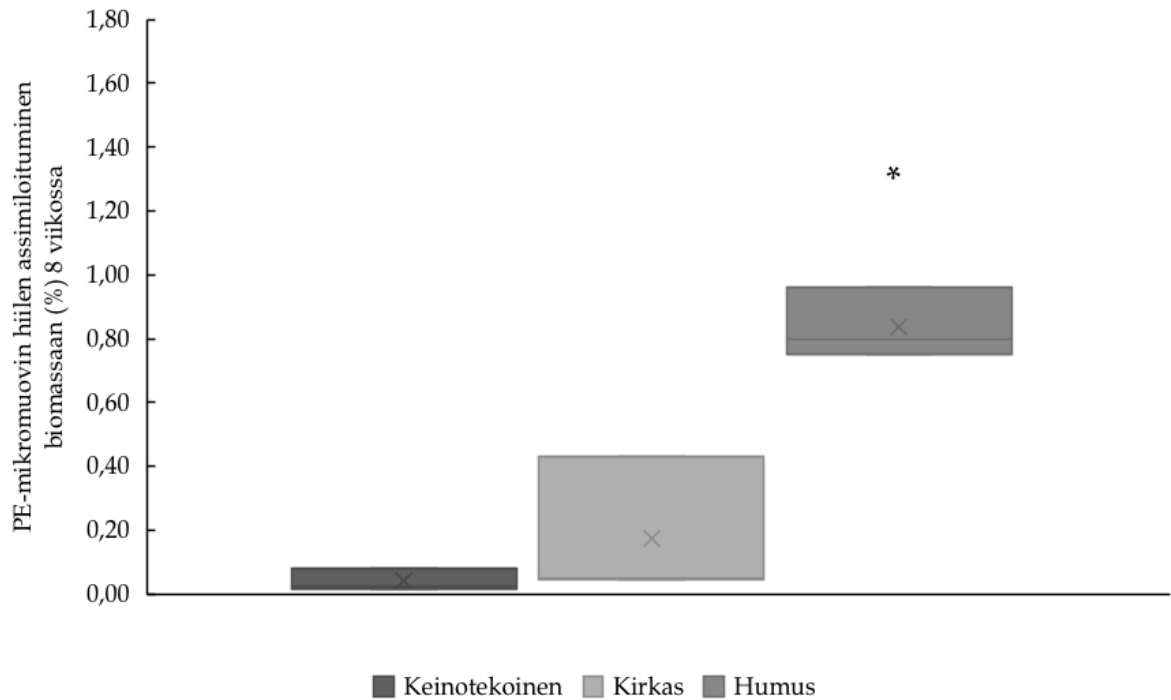
PE-mikromuovin hiilen mineralisoitumisella kahdeksassa viikossa havaittiin olevan tilastollisesti merkitsevä ero (ANOVA, $F_{2,6} = 25,225$, $p = 0,001$) koevesien välillä. Humuspitoisen koeveden mineralisaatio oli merkitsevästi nopeampaa kuin

keinotekoisien koeveden (Bonferroni Post-Hoc, $p = 0,002$) tai kirkkaan koeveden (Bonferroni Post-Hoc, $p = 0,004$). Kirkkaan koeveden ja keinotekoisien koeveden väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa (Kuva 8). Myös PE-mikromuovin hiilen assimiloitumisella mikrobien biomassaan havaittiin merkitsevä ero koevesien välillä (Welch ANOVA, $F_{2,2.99} = 58,383$, $p = 0,004$). Humuspitoisessa järvivedessä mikrobit assimiloivat PE-mikromuovin hiiltä biomassaansa nopeammin kuin keinotekoisessa (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,006$) tai kirkkaassa järvivedessä (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,040$). Kirkkaan koeveden ja keinotekoisien koeveden väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa (Kuva 9).

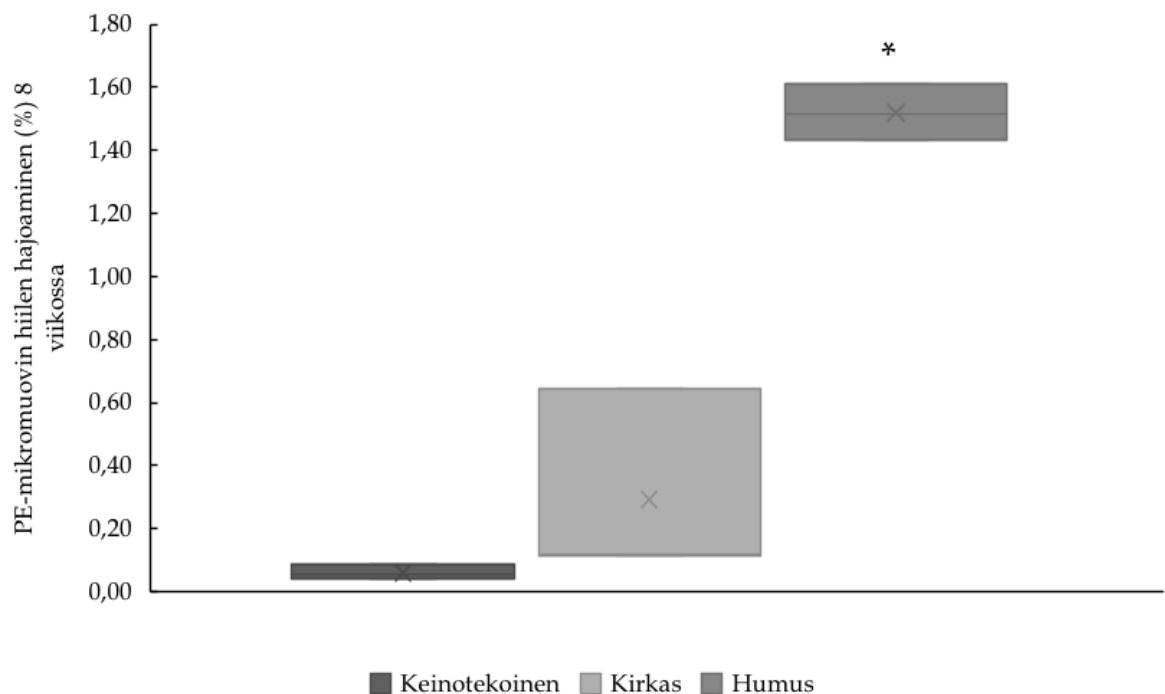
Kun vertailtiin koevesiä toisiinsa mineralisaation ja uuden biomassan rakentamisen summana, tilastollisesti merkitsevä ero havaittiin koevesien välillä (Welch ANOVA, $F_{2,2.86} = 307,540$, $p < 0,001$). Humuspitoisessa koevedessä mineralisaatio ja uuden biomassan rakentaminen kokonaisuutena oli nopeampaa kuin keinotekoisessa (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,001$) tai kirkkaassa (Games-Howell Post-Hoc, $p = 0,027$) koevedessä. Keinotekoisien ja kirkkaan koeveden väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa (Kuva 10).



Kuva 8. PE-mikromuovin hiilen mineralisoituminen (%) kahdeksassa viikossa keinotekoisessa ($n = 3$), kirkkaassa ($n = 3$) ja humuspitoisessa ($n = 3$) koevedessä. * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.



Kuva 9. PE-mikromuovin hiilen assimiloituminen mikrobien biomassaan (%) kahdeksassa viikossa keinotekoisessa (n = 3), kirkkaassa (n = 3) ja humuspitoisessa (n = 3) koevedessä. * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.

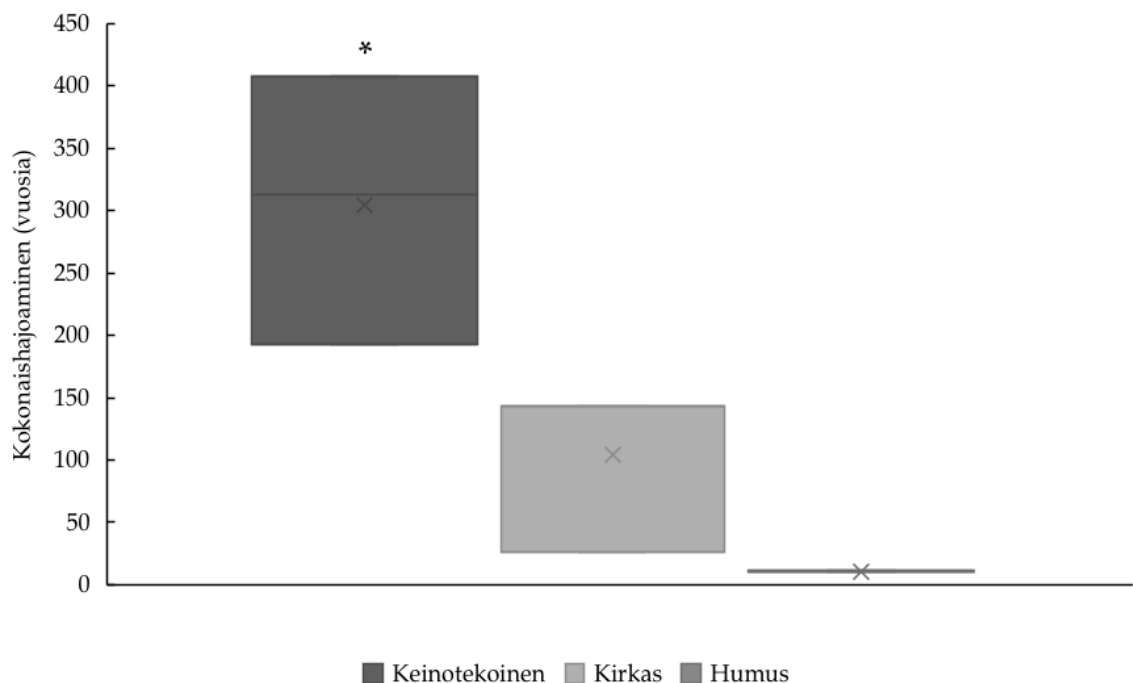


Kuva 10. PE-mikromuovin hiilen hajoaminen; mineralisaation (%) ja uuden biomassan rakentamisen (%) summa kahdeksassa viikossa keinotekoisessa (n = 3), kirkkaassa (n = 3) ja humuspitoisessa (n = 3) koevedessä. * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.

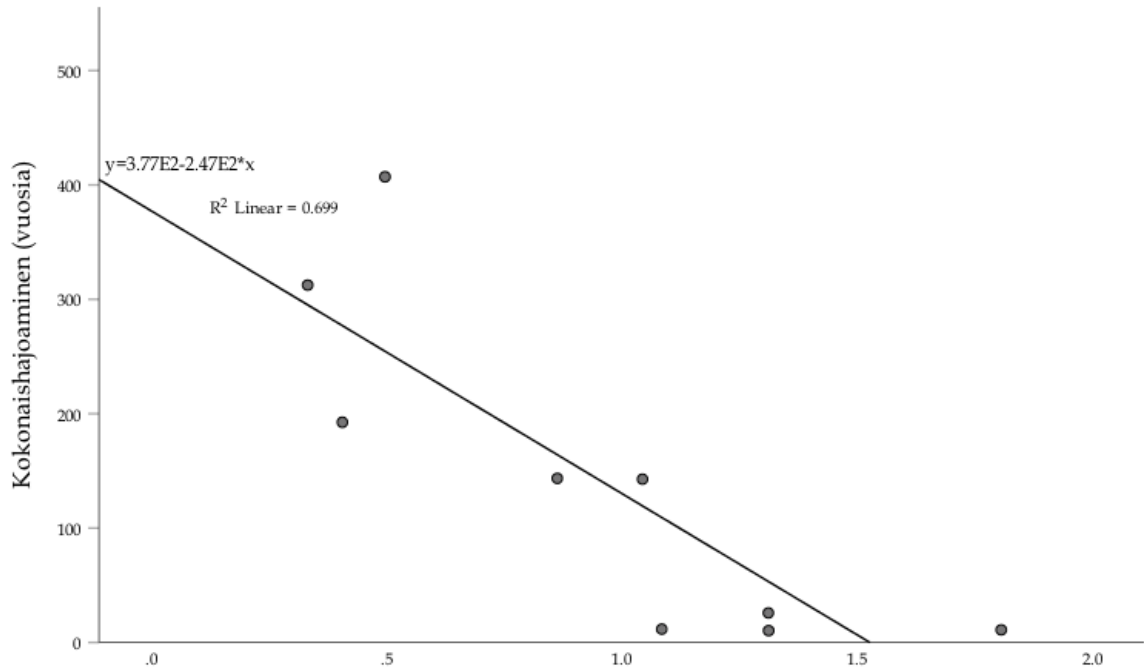
3.4 PE-mikromuovin hiilen hajoaminen boreaalisissa järvissä

Luonnonvesissä PE-mikromuovipartikkelin hajoaminen kokonaan kestäisi 10–144 vuotta (kirkas & humuspitoinen, Kuva 11), kun taas hajoaminen ilman mikrobitoimintaa (keinotekoinen, Kuva 11) kestäisi jopa 192–407 vuotta. PE-mikromuovipartikkeli hajoaisi huomattavasti hitaammin keinotekoisessa koevedessä, ja luonnonvesien ja keinotekoisien koeveden välillä havaittiinkin tilastollisesti merkitsevä ero (ANOVA, $F_{2,6} = 12,490$, $p = 0,007$). Keinotekoinen koevesi erosi tilastollisesti merkitsevästi sekä kirkkaasta koevedestä (Bonferroni Post-Hoc, $p = 0,047$) että humuspitoisesta koevedestä (Bonferroni Post-Hoc, $p = 0,008$). Kirkkaan koeveden ja humuspitoisen koeveden väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa PE-mikromuovin kokonaishajoamisessa.

Kun tarkasteltiin korrelaatiota kahden muuttujan välillä, havaittiin, että kokonaishajoaminen vuosissa korreloi voimakkaasti gram-negatiivisille bakteereille (alfa-/gammaproteobakteeri, Taipale ym. 2019) tyypillisen rasvahapon (18:1w7) kanssa (Linear Regression, $p = 0,005$, $R = 0,836$, $R \text{ Square} = 0,699$) (Kuva 12, Taulukko 2).



Kuva 11. PE-mikromuovipartikkelin kokonaishajoamiseen kuluva aika vuosissa, keinotekoisessa ($n = 3$, 192–407 vuotta), kirkkaassa ($n = 3$, 26–144 vuotta) ja humuspitoisessa ($n = 3$, 10–12 vuotta) koevedessä. * merkitsee tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, $p < 0,05$.



Kuva 12. Korrelaatio kokonaishajoamisen (vuosissa) ($n = 9$) ja gram-negatiivisille (alfa-/gammaproteobakteeri) bakteereille tyypillisen rasvahapon (18:1w7) pitoisuuden (g/l) välillä ($n = 9$). R^2 Linear = 0,699 eli 69,9 % vastemuuttujan (kokonaishajoaminen vuosissa) varianssista selittyy selittävällä muuttujalla (PLFA_{18:1w7} pitoisuus).

Taulukko 2. PLFA-rasvahapot biomarkkereina (alkuperäinen lähde: Willers ym. 2015, muokattu).

PLFA biomarkkerit	Vastaavuus	Alkuperäinen lähde
Suoraketjuiset tyydyttyneet rasvahapot		
14:0; 15:0; 16:0; 17:0; 18:0	Yleinen bakteerimarkkeri	Zelles (1997)

Yksittäistydyttymättömät rasvahapot		
14:1w5c; 15:1; 15:1w6c; 16:1w7t; 16:1w9c; 16:1w11c; 17:1; 18:1w5c; 19:1w9c; 19:1w12c; 20:1w9c; 20:1w9t; 22:1w9c; 22:1w9t;	Gram-negatiiviset bakteerit	Wilkinson (1988); Zelles (1997)
16:1w5c	Mykorritsa-sieni	Pacovsky ja Fuller (1988); Olsson ym. (1995)
16:1w7c	Gram-negatiiviset bakteerit, syanobakteerit; piilevä	Wilkinson (1998), Ahlgren ym. (1992)
18:1w7c	Syanobakteerit; piilevä, gram-negatiiviset bakteerit	Ahlgren ym. (1992), Wilkinson (1998)
18:1w9c	Syanobakteerit; viherlevä, sienet	Ahlgren ym. (1992), Vestal ja White (1989)
Haaroittuneet rasvahapot		
a13:0; i13:0; i14:0; i15:0; a15:0; i16:0; a17:0; a18:0; i18:0	Gram-positiiviset bakteerit	O'Leary ja Wilkinson (1988); Vestal ja White (1989)
Monityydyttymättömät rasvahapot		
18:2w6c; 18:3w6c	Saprotrofi-sieni, Syanobakteerit; piilevä	Federle (1986); Stahl ja Klug (1996), Ahlgren ym. (1992)

4 TULOsten TARKASTELU

Tutkimuksessani keskityin tutkimaan mikrobien roolia mikromuovin hajotuksessa, enkä tutkinut varsinaisia kemiallisia hajotusreaktioita. Happipitoisuuden lasku lähes viikoittain antaisi kuitenkin ymmärtää, että happea on käytetty hengitykseen ja mineralisaatioon, jonka lopputuloksena syntyy hiilidioksidia. Tämä kertoo siitä, että pulloihin lisätyn mikromuovin hiiltä on todennäköisesti käytetty hyödyksi, samalla sitoen happea.

Lopullinen pitoisuus polyeteenimikromuovia tutkimuksessa oli noin 11 mg C/l (vastaa $131\ 613 < 20\ \mu\text{m}$ kokoista polyeteenipartikkeliä litrassa tai $1690 > 20\ \mu\text{m}$

kokoista polyeteenipartikkelia litrassa, Taipale ym. 2019), joka on suurempi kuin vastaavasti luonnonvesistä löydetyt pitoisuudet (Su ym. 2016, Imhof ym. 2013), lukuun ottamatta Hurley ym. (2018) tutkimustuloksia. Toisaalta, 99 % tutkimuksessa käytetystä mikromuovista oli kooltaan alle 20 µm, mikä on mikromuovin havaitsemisraja luonnollisissa vesissä. Luonnonvesien mikro- ja nanomuovipitoisuus voi siis voi olla paljon luultua suurempi, koska laitteistolla ei pystytä havaitsemaan alle 20 µm kokoisia partikkeleita (Xu ym. 2020).

Tulokset mikromuovilla rikastetuissa koevesissä kahdeksan viikon aikana osoittivat nopeampaa mikromuovin hiilen mineralisoitumista humuspitoisessa koevedessä kuin keinotekoisessa tai kirkkaassa koevedessä. Myöskin mikromuovin hiilen assimiloituminen mikrobien biomassaan oli selkeästi nopeampaa humusvesissä kokeen aikana. Mikromuovipartikkelin kokonaishajoaminen oli merkittävästi hitaampaa keinotekoisessa makeassa vedessä verrattuna luonnonvesiin (kirkas, humus), joista löytyy mikrobitoimintaa. Luonnonvesien väliltä ei löytynyt kuitenkaan merkitsevää eroa kokonaishajoamiseen kuluvassa ajassa, mikä antaa ymmärtää, että molemmissa vesissä asustaa mikromuovipartikkelin hajottamiseen osallistuvia hajottajamikrobeja.

Rasvahappojen isotooppitulokset osoittivat rasvahappojen (MUFA, SAFA, BrFA, LIN) ¹³C-leimaantumista kaikissa käsittelyissä, mikä kertoo siitä, että mikromuovin hiiltä käytettiin suoraan mikrobialiseen kasvuun ja solukalvojen rakentamiseen. Mitä rikastuneempi rasvahappo oli, sitä todennäköisemmin näytteessä oli tätä rikastunutta rasvahappoa vastaavia mikrobisyhteisöjä, jotka hyödynsivät mikromuovin hiiltä (Boschker ja Middelburg 2002). Vaikka PLFA-biomarkkerien avulla mikrobien tunnistusta ei voida toteuttaa lajitasolla, useita mikrobiryhmiä voidaan tunnistaa biomarkkereiden ansiosta (Willers ym. 2015). Tutkimuksessa löytyneiden, ja mikromuovin hiilellä rikastuneiden rasvahappojen ansiosta voidaan päätellä, mitkä mikrobiryhmät olivat mikromuovin hajoamisen taustalla. Kun tuloksia rasvahappojen leimaantumisesta (Kuva 6) vertaa Willers ym. (2015) kokoamaan taulukkoon (Taulukko 2) ja Carvalhon ja Caramujon (2014) tutkimuksiin PLFA-biomarkkereista, voidaan todeta, että humuspitoisessa ja kirkkaissa koevesissä olivat leimaantuneet tietyt fosfolipidibiomarkkerit.

Mikromuovin hajoamisesta järvivedessä selittää siis pääosin tietyt mikrobit, kuten havaittiin regressioanalyysin tuloksissa voimakkaasti korreloiva vaikutus gram-negatiivisille bakteereille tyypillisen rasvahapon pitoisuuden ja kokonaishajoamisen välillä (Kuva 12). Keinotekoisessa ja kirkasvetisessä järvivedessä rasvahappojen leimaantuminen ei kuitenkaan ollut yhtä selkeää kuin humuspitoisessa järvivedessä. Tuloksien pohjalta voidaan kuitenkin vetää johtopäätös, että mikromuovin hajottamiseen osallistuivat gram-negatiiviset bakteerit, sillä niiden fosfolipidibiomarkkerit olivat leimaantuneet sekä humuspitoisessa että kirkkaassa järvivedessä. Koska humusvesissä leimaantuminen oli voimakkaampaa, ja siinä myös gram-positiivisten sekä sienien fosfolipidibiomarkkerit olivat leimaantuneet, voidaan myös olettaa, että humuspitoisissa järvivesissä asustaa laajempi hajottajamikrobisto. Lisäksi, humusveden matala perustuotanto vaikuttaa osaltaan mikrobien kykyyn hyötykäyttää orgaanista hiiltä. Kirkasvetisissä järvissä, joissa perustuotanto on suurta, ja liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrä matala, löytyy enemmän muita ravinnonlähteitä mikrobeille kuin humusrikkaassa järvivedessä (Faithfull ym. 2015).

Koelämpötila koehuoneessa oli melko korkea ($20 \pm \frac{1}{2}$ °C) boreaalisella vyöhykkeellä vallitsevaan luonnolliseen lämpötilaan nähden (Kolari ym. 2006). Lämpötila tutkimuksessa vastasikin lämpimän kesän lämpötilaa, joka kestää vain lyhyen aikaa koko vuodesta. Näin ollen tutkimustulosten perusteella lasketut hajoamisnopeudet eivät ole suoraan verrannollisia todelliseen tilanteeseen luonnossa. Todellinen mikromuovin hajoamisaika onkin todennäköisesti paljon pidempi. On myös hyvä pitää mielessä, että järvivesinäytteet oli kerätty eri vuodenaikoina. Humusveden aineisto oli kerätty syksyllä, kun taas kirkasvetisen järven aineisto oli kerätty kesällä. Kesällä järvien perustuotanto yleensä kiihtyy valoisan ajan lisääntyessä (Tanabe ym. 2019), ja tällä on myös voinut olla vaikutusta tuloksiin. Jatkossa tulisikin testata, eroavatko samaan vuodenaikaan otettujen järvinäytteiden tulokset merkitsevästi toisistaan toistamalla kokeen isommalla otoskoolla. Näin minimoitaisiin mahdollisten eriävien olosuhteiden aiheuttamat vasteet tutkimustuloksiin. Lisäksi tilastollinen testaus olisi mielekkäämpää isommalla otanta-joukolla.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimustulosten perusteella on selvää, että mikrobit käyttivät polyeteenimikromuovia mineralisaation lisäksi uuden biomassan rakentamiseen selkeästi enemmän humusvesissä kuin kirkkaissa järvivesissä. Tuloksien perusteella on myös selvää, että polyeteenimikromuovipartikkelit hajoavat merkitsevästi nopeammin humuspitoisissa ja kirkkaissa järvivesissä kuin keinotekoisessa makeassa vedessä. Tilastollista merkitsevyyttä ei kuitenkaan havaittu humuspitoisen ja kirkkaan järveden välillä. Tämä osoittaa myös sen, että polyeteenimikromuovin hajoamista tapahtuu luonnonvesissä, ja mikromuovia hyödynnetään rakennusaineena tärkeille rasvahapoille. Tulokset viittaavat, että polyeteeniä hajottavat mikrobit ovat gram-negatiivisia bakteereita, sillä näiden fosfolipidibiomarkkerit olivat leimaantuneet sekä kirkkaassa että humuspitoisessa järvedessä. Humuspitoisissa järvivesissä leimaantuivat myös gram-positiivisten ja sienien spesifiset fosfolipidibiomarkkerit, joka osoittaa sen, että humuspitoisista järvistä löytyy laajempi hajottajamikrobisto. Lopuksi tulosten perusteella kävi ilmi, että polyeteenimikromuovipartikkelit hajoavat luultua nopeammin optimiolosuhteissa, mutta jopa satoja vuosia ilman hajottajamikrobeja.

KIITOKSET

Haluan ensimmäisenä kiittää ohjaajaani dosentti Sami Taipaletta, joka on sinnikkäästi tukenut minua opinnäytetyöni valmiiksi saattamisessa, ja periksiantamattomasti vastailut lukemattomiin kysymyksiini. Haluan myös kiittää ohjaajiani professori Marja Tirolaa ja professori Jussi Kukkosta tuesta ja opastuksesta projektin varrella. Osoitan myös lämpimät kiitokseni Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriohenkilökunnalle, varsinkin Mervi Koistiselle ja Emma Pajuselle, joilta sain paljon apua laboratoriotyöskentelyyn.

KIRJALLISUUS

- Anderson J. C., Park B. J. & Palace V. P. 2016. Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. *Environmental Pollution*. 218: 269–280, doi:10.1016/j.envpol.2016.06.074.
- Andrady A. L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 62(8): 1596–1605, doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Arvola L., Salonen K. & Rask. M. 1999. Trophic interactions. *Limnology of Humic Waters*, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. 265–279.
- Auta H., Emenike C. & Fauziah S. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Int.* 102, 165–176, doi: 10.1016/j.envint.2017.02.013.
- Auta H. S., Emenike C. U., Jayanthi B. & Fauziah S. H. 2018. Growth kinetic and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodoccus* sp. isolated from mangrove sediment. *Mar. Pol. Bull.* 127: 15–21, doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.036.
- Boschker H. T. S. & Middelburg J. J. 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecology*. 40(2): 85–95, doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00940.x.
- Browne M. A., Dissanayake A., Galloway T. S., Lowe D. M. & Thompson R. C. 2008. Ingested microscopic plastic translocate to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environ. Sci. Technol.* 42: 5026–5031, doi:10.1021/es800249a.
- Carpenter E. J. & Smith Jr. K. L. 1972. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*. 175: 1240–1241, doi :10.1126/science.175.4027.1240.
- Carvalho C. C. C. R. & Caramujo M-J. 2014. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds. *Molecules*. 19(5): 5570–5598, doi:10.3390/molecules19055570.
- Chandra R. & Rustgi R. 1998. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 23: 1273–1335, doi :10.1016/S0079-6700(97)00039-7.
- Cole M., Lindeque P., Halsband C. & Galloway T. S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pol. Bull.* 62: 2588–2597, doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Cui R., Kim S. W. & An Y.-J. 2017. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. *Sci. Health*. 1: 47–51, doi:10.1038/s41598-017-12299-2.
- Desvillettes CH., Bourdier G., Amblard CH. & Barth B. 1997. Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and

- microalgae. *Freshwater Biology*. 38: 629–637, doi:10.1046/j.1365-2427.1997.00241.x.
- Faithfull C. L., Mathisen P., Wenzel A., Bergström A. K. & Vrede T. 2015. Food web efficiency differs between humic and clear water lake communities in response to nutrients and light. *Oecologia*. 177: 823–835, doi:10.1007/s00442-014-3132-2.
- Fendall L. S. & Sewell M. A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*. 58(8): 1225–1228, doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.025.
- Geyer R., Jambeck J. R. & Law K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3(7), doi:10.1126/sciadv.1700782.
- Hall N. M., Berry K. L. E., Rintoul L. & Hoogenboom M. O. 2015. Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Mar. Biol.* 162: 725–732, doi:10.1007/s00227-015-2619-7.
- Horton A. A., Walton A., Spurgeon D. J., Lahive E. & Svendsen C. 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *The Science of the total environment*. 586: 127–141, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.190.
- Hurley R., Woodward J. & Rothwell J. J. 2018. Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding. *Nature Geoscience*. 11: 251–257, doi:10.1038/s41561-018-0080-1.
- IAEA-TECDOC-825. Reference and intercomparison materials for stable isotopes light elements. IAEA, Vienna, 1995. ISSN 1011–4289.
- Imhof H. K., Ivleva N. P., Schmid J., Niessner R. & Laforsch C. 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology*. 23(19): 867–868, doi:10.1016/j.cub.2013.09.001.
- Jiang P., Zhao S., Zhu L. & Li D. 2017. Microplastic-associated bacterial assemblages in the intertidal zone of the Yangtze Estuary. *Sci. Total Environ.* 624: 48–54, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.105.
- Kolari P., Lappalainen H. K., Hänninen H., & Hari P. 2006. Relationship between temperature and the seasonal course of photosynthesis in Scots pine at northern timberline and in southern boreal zone. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*. 53:3, 542–552, doi:10.1111/j.1600-0889.2007.00262.x.
- Kooi M., Besseling E., Kroeze C., van Wezel A. P. & Koelmans A. A. 2018. Modeling the Fate and Transport of Plastic Debris in Freshwaters: Review and Guidance. *Freshwater Microplastics*. Hdb Env Chem 58, doi:10.1007/978-3-319-61615-5_7.
- Lu Y., Zhang Y., Deng Y., Jiang W., Zhao Y., Geng J., Ding L. & Ren H. 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebra fish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environ. Sci. Technol.* 50: 4054–4060, doi:10.1021/acs.est.6b00183.
- Mendoza L. M. R., Karapanagioti H. & Álvarez N. R. 2017. Micro(nanoplastics) in the marine environment: current knowledge and gaps. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 1: 47–51, doi:10.1016/j.coesh.2017.11.004.

- Michener R. H & Kaufman L. 2007. Stable Isotope Ratios as Tracers in Marine Food Webs: An Update. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Second Edition: 238–282.
- Monteith D. T., Stoddard J. L., Evans C. D., De Wit H. A., Forsius M., Høgåsen T., Wilander A., Skjelkvåle B. L., Jeffries D. S, Vuorenmaa J., Keller B., Kopáček J. & Vesely J. 2007. Dissolved organic carbon trends resulting from changes in atmospheric deposition chemistry. *Nature*. 450: 537, doi:10.1038/nature06316.
- Müller R-J., Kleeberg I. & Deckwer W. D. 2000. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*. 82(2): 87–95, doi:10.1016/s0168-1656(00)00407-7.
- Nolte T. M., Hartmann N. B., Kleijn J. M., Garnoes J., Van de Meent D., Hendriks A. & Baun A. 2017. The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquat. Toxicol.* 183: 11–20, doi:10.1016/j.aquatox.2016.12.005.
- Pace M. L., Cole J. J., Carpenter S. R., Kitchell J. F., Hodgson J. R., Van de Bogert M. C., Bade D. L, Kritzberg E. S. & Bastviken D. 2004. Whole-lake carbon-13 additions reveal terrestrial support of aquatic food webs. *Nature*. 427: 240–243, doi:10.1038/nature02227.
- Paco A., Duarte K., Da Costa J. P., Santos P. S. M., Pereira R., Pereira M. E., Freitas A. C., Duarte A. C., Rocha-Santos T. A. P. 2017. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Sci. Total Environ.* 586: 10–15, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.017.
- Railo S., Talvitie J., Setälä O., Koistinen A. & Lehtiniemi M. 2018. Application of an enzyme digestion method reveals microlitter in *Mytilus trossulus* at a wastewater discharge area. *Marine Pollution Bulletin*. 130: 206–214, doi:10.1016/j.marpolbul.2018.03.022.
- Restrepo-Flórez J-M., Bassi A. & Thompson M. R. 2014. Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 88: 83–90, doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.014.
- Schwarcz H. P & Schoeninger M. J. 1991. Stable isotope analyses in human nutritional ecology. *Yearbook of physical anthropology* 34: 283–321, doi:10.1002/ajpa.1330340613.
- Su L., Xue Y., Li L., Yang D., Kolandhasamy P., Li D. & Shi H. 2016. Microplastics in Taihu Lake, China. *Environmental Pollution*. 216: 711–719, doi:10.1016/j.envpol.2016.06.036.
- Taipale S. J., Peltomaa E., Kukkonen J. V. K., Kainz M. J., Kautonen P. & Tirola M. 2019. Tracing the fate of microplastic carbon in the aquatic food web by compound-specific isotope analysis. *Scientific Reports*. 9: 19894, doi:10.1038/s41598-019-55990-2.
- Talvitie J., Mikola A., Koistinen A. & Setälä O. 2017. Solutions to microplastic pollution – removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research*. 123: 401–407, doi:10.1016/j.watres.2017.07.005.

- Tanabe Y., Hori M., Mizuno A. N., Osono T., Uchida M., Kudoh S. & Yamamuro M. 2019. Light quality determines primary production in nutrient-poor small lakes. *Scientific Reports*. 9: 4639, doi:10.1038/s41598-019-41003-9.
- Weinstein J. E., Crocker B. K. & Gray A. D. 2016. From macroplastic to microplastic: degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. *Environ. Toxicol. Chem.* 35: 1632–1640, doi:10.1002/etc.3432.
- Willers C., Jansen van Rensburg P. J. & Claassens S. 2015. Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities – review of interpretations and recent applications. *Journal of Applied Microbiology*. 119: 1207–1218, doi:10.1111/jam.12902.
- Xu Z., Sui Q., Li A., Sun. M., Zhang L., Lyu S. & Zhao W. 2020. How to detect small microplastics (20–100 um) in freshwater, municipal wastewaters and landfills leachates? A trial from sampling to identification. *Science of the Total Environment*. 733: 139218, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139218.
- Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Kiyotsuna T., Miyamoto K., Kimura Y. & Oda K. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 351: 1196–1199, doi:10.1126/science.aad6359.
- Zhang Q-L & Li W-J. 1987. A calibrated measurement of the atomic weight of carbon. *Chinese Science Bulletin*. Vol. 35 No. 4. 290–296 (1990).