

Juuso Kauppila

KLOORIETEENIEN ANAROBISTA DE- HALOGENAATIOTA TEHOSTAVAT SUBSTRAATIT, NIIDEN OMINAISUU- DET JA VAIKUTUSMEKANISMIT

Opinnäytetyö

Tekniikan ammattikorkeakoulututkinto

Ympäristötekniologia

Toukokuu 2021



**Kaakkois-Suomen
ammattikorkeakoulu**

Tekijä/Tekijät	Tutkintonimike	Aika
Juuso Kauppila	Ympäristöinsinööri (AMK)	Toukokuu 2021
Opinnäytetyön nimi		
Kloorieteenien anaerobista dehalogenaatiota tehostavat substraatit, niiden ominaisuudet ja vaikutusmekanismit		45 sivua 19 liitesivua
Toimeksiantaja		
Doranova Oy		
Ohjaaja		
Mikko Myllymäki		
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää Doranova Oy:lle oma ARD (Anaerobic Reductive Dehalogenation) -substraatti, joka on yhtä tehokas tai tehokkaampi kuin markkinoilla olevat kaupalliset substraatit. Maaperään päätyessään vettä raskaampien kloorieteenien on mahdollista päästä pohjaveteen ja näin pilata se. Kloorieteenillä pilaantunut maaperä ja pohjavesi on mahdollista kunnostaa in situ tapahtuvalla biostimulaatiolla, jossa maaperään syötetään tietynlaisia substraatteja. Tärkeimpinä dekloraus bakteereina pidetään <i>dehalococoides</i> spp. suvun bakteereita. Ne tarvitsevat välttämättömiä ravintoaineita kasvaakseen, kuten vetyä elektronin luovuttajaksi, asetaattia hiilen lähteeksi, kloorattuja yhdisteitä elektronin vastaanottajaksi ja B12-vitamiinia kasvaakseen.</p> <p>Kokeet suoritettiin Doranova Oy:n tiloissa anaerobisissa olosuhteissa. Kokeissa reaktiopulloihin lisättiin pilaantunutta pohjavettä ja tarkoin valittuja substraatteja. Reaktiopulloissa tapahtuvaa deklorinaatiota seurattiin ottamalla näytteitä. Otetut näytteet lähetettiin analysoitavaksi laboratorioon. Tuloksina saatiin dataa, joka kertoi reaktiopullojen sen hetkisestä kloorieteenien pitoisuuksista.</p> <p>Tulosten perusteella ei voida osoittaa, että jotkut substraatit olisivat olleet tehokkaampia kuin käytössä ollut kaupallinen substraatti. Molemmat kokeet jouduttiin keskeyttämään 20 päivää kokeen aloittamisesta johtuen nolla näytteen muutoksista.</p>		
Asiasanat		
Bioremediaatio, Fermentointi, B12- vitamiini, Substraatit		

Author (authors)	Degree	Time
Juuso Kauppila	Bachelor of Engineering	May 2021
Thesis title		45 pages
Substrates enhancing the anaerobic dehalogenation of chlorinated ethenes, their properties and mechanisms of action		19 pages of appendices
Commissioned by		
Doranova Oy		
Supervisor		
Mikko Myllymäki		
<p>The goal of this thesis was to develop Doranova Oy their own ARD (Anaerobic reductive dehalogenation) substrate which would be as effective or more effective than other commercial substrates on the market. Because chlorinated ethenes are heavier than water it is possible for them to enter the groundwater and thus contaminate it. It is possible to remediate soil and groundwater contaminated by chlorinated ethenes with in situ biostimulation in which certain types of substrates are injected into the soil. The most important bacteria for dechlorination is considered to be <i>Dehalococcoides</i> spp. genus bacteria. They need essential nutrients to grow, such as hydrogen as electron donor, acetate as a carbon source, chlorinated compounds as electron acceptor and vitamin B12 for growth.</p> <p>The experiments were performed at Doranova Oy's premises under anaerobic conditions. In these experiments contaminated groundwater and carefully selected substrates were added to reaction bottles. The dechlorination in reaction bottles was monitored with samples. Samples taken from the reaction bottles were sent to the laboratory for analysis. The result was data which revealed the current chlorinated ethenes concentrations in the reaction bottles.</p> <p>The results do not show that some substrates were more effective than commercial substrate used. Both experiments had to end 20 days after the start of the experiments due zero sample changes.</p>		
Keywords		
Bioremediation, Fermentation, B12-vitamin, Substrate		

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	TEORIA	2
2.1	Klooratut liuottimet	4
2.1.1	Stoikometria	6
2.2	Dehalorespiraatioon kykenevät bakteerit	6
2.2.1	Kasvuedellytykset	9
2.3	Metanogeenit	10
2.4	Substraattityypit	10
2.4.1	Liukoiset substraatit	11
2.4.2	Viskoosiset substraatit	13
2.4.3	Kiinteät substraatit	15
2.4.4	Kokeelliset substraatit	16
2.5	Substraattien ja niiden sisältämien komponenttien optimaaliset pitoisuudet	18
2.5.1	B12- vitamiini	18
2.5.2	Koboltti	21
2.5.3	pH:n muokkaajat ja ravinteet	21
2.6	Fermentoituminen	22
2.6.1	Pimeä fermentaatio	23
2.7	Dimetyylibentsimidatsole	27
2.8	Maaperässä vedystä kilpailevat elektronin vastaanottajat	27
2.8.1	Liennut happi	28
2.8.2	Nitraatti	28
2.8.3	Rauta (II) ja Mangaani (II)	28
2.8.4	Sulfaatti	28
2.9	Kaupalliset substraatit	29
2.10	Substraatin kulutuksen arvioiminen	29
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	32

4	TULOKSET JA TARKASTELU	32
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	40
	LÄHTEET	42

LIITTEET

Liite 1. Laskut

Liite 2. Työn suoritus

Liite 3. Koe 2

Liite 4. Koe 1

Lyhenteet

Advektio	Aineen tai määrän kulkeutumista nesteen liikkeen mukana
Antropogeeninen	Ihmislajin toiminnan aiheuttama
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
Biovety	Vety, joka on tuotettu biologisesti
CAH	Klooratut alifaattiset hiilivedyt
DCE	Dikloorieteeni
De novo	Monimutkaisten biomolekyylien muodostuminen yksinkertaisista molekyyleistä
Diffuusion	Ilmiö, jossa molekyylit pyrkivät siirtymään väkevämästä pitoisuudesta laimeampaan ajan mittaan tasottaen mahdolliset pitoisuuserot
Dispersio	Seos, jossa aineet ovat tasaisesti jakautuneet
DMBI	5,6-dimetyylibenzimidazole
FMN	Flaviinimononukleotidi
Heterotrofinen	Eliö, joka pysty itse tuottamaan tarvitsemaansa energiaa
Homokysteiini	Metioniinin aineenvaihduntatuotteena syntyvä aminohappo
In situ	Käsittely tapahtuu paikan päällä kohteessa
Kahtaisioninen	Molekyyli, jossa on yksi tai useampi hapan- ja emäksinen ryhmä
Katabolia	Aineenvaihdunta, jolle on ominaista energiaa sisältävien yhdisteiden pilkkoutuminen

Litologia	Kivilajien järjestelmällinen kuva, joka perustuu mineraalirakenteeseen ja koostumukseen
Makromolekyyli	Molekyyli, jolla on suhteellisen suuri molekyylimassa, tai rakenne, joka sisältää paljon toistuvia rakenneyksiköitä
Metabolia	Aineenvaihdunta
NAD ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
NADH	NAD ⁺ pelkistynyt muoto
Osmoregulaatio	Eliöiden nestetasapainon säätely, kun ympäristö suolapitoisuus on eliön suolapitoisuutta matalampi tai korkeampi
PCE	Tetrakloorieteeni
Riboflaviini	B2- vitamiini
SAM	S-adenosyylimetioniini
TCE	Trikloorieteeni
VC	Vinyylikloridi
Vetytrofinen	Organismi, joka saa energiaa vedyn metabolisoinnista

1 JOHDANTO

Teollisuudessa kloorieteeneitä on käytetty erilaisissa liimoissa, rasvanpoisto- ja puhdistusaineena sekä PVC-muovin ja -hartsien valmistuksessa. Maaperään päätyessään vettä raskaampien kloorieteeneiden on mahdollista päästä pohjaveteen ja näin pilata se. (OVA-ohjeet 2020).

Kloorieteeneillä pilaantunut maaperä ja pohjavesi on mahdollista kunnostaa in situ tapahtuvalla biostimulaatiolla, jossa maaperään syötetään tietynlaisia substraatteja. (Goswani ym. 2018.) Tällä hetkellä substraattien osuus kunnostusurakan kokonaisbudjetista saattaa olla jopa puolet kokonaiskuluista.

Koska maaperässä vallitsevat anaerobiset olosuhteet, on vedyn luovuttamisen todettu olevan tärkeässä roolissa anaerobisessa deklorinaatiossa. Maaperä sisältää kuitenkin muitakin elektronin vastaanottajia, jotka kilpailevat vedystä kloorattujen alifaattisten hiilivetyjen kanssa. (The Interstate Technology & Regulatory Council 2008, 17.)

Tärkeimpinä dekloraus bakteereina pidetään *dehalococcoides* spp. suvun bakteereita. Ne tarvitsevat välttämättömiä ravintoaineita kasvaakseen, kuten vetyä elektronin luovuttajaksi, asetaattia hiilen lähteeksi, kloorattuja yhdisteitä elektronin vastaanottajaksi ja B12- vitamiinia kasvaakseen. (Miura ym 2015.)

Maaperään syötettävät substraatit voidaan jakaa fysikaalisilta ominaisuuksiltaan kolmeen eri ryhmään: Liukoisiin, viskoosisiin ja kiinteisiin substraatteihin, jotka eroavat toisistaan niiden käyttäytymisellä maaperässä ja kuinka nopeasti ne ovat mikrobien käytettävissä. (...Solvents 2004.) Mikrobien toimesta tapahtuvalla fermentaatiolla saadaan vetyä ja asetaattia *Dehalococcoidesien* käytettäväksi. *Dehalococcoides*:ien kasvuun tarvittava B12- vitamiinin tuotanto tapahtuu myös mikrobien toimesta (Fang ym. 2017). Ongelmana on kuitenkin B12-vitamiinin muodostumiseen tarvittava DMBI, jonka muodostuminen tarvitsee happea (Chamlagain 2016).

Jotta substraatin kustannukset olisivat huomattavasti pienemmät kuin nyt käytössä olevan substraatin, on substraatteja haettu teollisuuden jätteistä ja sivuvirroista. Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa eri substraattien deklloorinaatio kykyä verrattiin kaupallisen substraatin deklloorinaatio kykyyn. Kokeet suoritettiin Doranova Oy:n tiloissa. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää Doranova Oy:lle oma ARD(Anaerobic Reductive Dehalogenation)-substraatti, joka on yhtä tehokas tai tehokkaampi kuin markkinoilla olevat substraatit.

2 TEORIA

Bioremediaatio, eli biopuhdistus voidaan luokitella kahteen päätyyppiin: Biostimulaatioon ja bioaugmentaatioon. Bioaugmentaation tarkoituksena on lisätä mikro-organismeja maaperään ja nopeuttaa parantaa epäpuhtauksien hajoamista. Bioaugmentaatio sisältää tarkoin valikoitujen ja rikastettujen mikrobijelmien toimittamisen maaperään nopeuttamaan epäpuhtauksien hajoamista tapauksissa, jossa maaperässä jo alunperin olleet mikrobit, eivät pysty täysin hajottamaan epäpuhtauksia tai hajoamisnopeudet ovat liian alhaiset. (Goswani ym. 2018.)

Biostimulaatio on kunnostustekniikka, joka on oikein toteutettuna tehokas, kustannustehokas ja ympäristöystävällinen (Adams ym. 2015). Sen tarkoituksena on lisätä mikrobien aktiivisuutta lisäämällä oikeaan aikaan oikeita ravinteita (Bhandari ym. 2007, 224). Biostimulaatiolla tarkoitetaan mikrobien kasvua rajoittavien ravintoaineiden, kuten typen, hapen, fosforin ja elektroninluovuttajien lisäämiseen saastuneisiin paikkoihin stimuloimaan jo maaperässä olevia bakteereja hajottamaan myrkyllisiä ja vaarallisia epäpuhtauksia. Biostimulaatioon vaikuttavat muutamat ympäristöparametrit, kuten kosteus, pH ja lämpötila. (Goswani ym. 2018.) Biostimulaation etuna pidetään, että sen toteutus tapahtuu maaperässä jo olevilla natiiveilla mikro-organismeilla, jotka sopivat hyvin maanalaiseen ympäristöön ja ovat siellä hyvin alueellisesti jakautuneita. Haasteena on lisäaineiden lisääminen maaperään tavalla, joka sallii niiden olevan hyvin mikro-organismien käytettävissä. Maanalainen läpäisemätön ja tiukka litologia taas luo haasteita lisäaineiden levittämiseen koko alueelle. Ravinteiden lisääminen voi myös edistää heterotrofisten mikro-organismien kasvua, jotka eivät luontaisesti hajota hiilivetyjä ja voivat näin luoda kilpailua

(Adams ym. 2015, 31.) Biostimulaatio voidaan suorittaa onnistuneesti sekä ex-situ ja in-situ käyttämällä anaerobisia ja aerobisia bakteereita (Bhandari ym. 2007, 235) ja sitä pidetäänkin kaikista bioremediaatiotekniikoista tehokkaimpana menetelmänä hiilivetyjen puhdistamiseksi (Goswani ym. 2018).

Bioremediaatiokohteissa olevat epäpuhtaudet hajoavat käytyään läpi biokemiallisia reaktioita, joihin sisältyy erilaisia aerobisia reaktioita, anaerobisia hapettavia reaktioita, anaerobisia pelkistäviä reaktioita ja kometabolisia reaktioita. Jotta anaerobinen reduktiivinen bioremediaatio voi tapahtua, on happi kulutettava ensin pois. (Thomas & Su 2015.)

Kometabolinen bioremediaatio on reaktio, jossa anaerobisessa ympäristössä mikrobien metabolian aikana tuotetut epäspesifiset entsyymit vähentävät epäpuhtauksia. Kometaboliaa esiintyy, kun mikro-organismit käyttävät yhtä yhdistettä energianlähteenä ja samalla tuottavat entsyymiä, joka kemiallisesti muuttaa toisen yhdisteen. Tämän seurauksena organismit voivat hajottaa haittaainetta saamatta yhtään energiaa reaktiossa. (Thomas & Su 2015.)

Anaerobisissa olosuhteissa lopputuotteena saadaan metaania, hiilidioksidia ja vetykaasua, kun mikro-organismit metabolisoivat orgaaniset epäpuhtaudet. Kun anaerobisissa reaktioissa epäpuhtauden atomi korvataan vedyllä, bakteerit saavat energiaa ja näin niiden lukumäärä kasvaa. Anaerobinen aineenvaihdunta sisältää monia prosesseja, kuten metanogeneesin, fermentaation, reduktiivisen deklloorauksen, denitrifikaation ja sulfaattia ja rautaa vähentävät toimet. Ne, mitkä näistä prosesseista tapahtuvat, riippuu täysin epäpuhtaudesta. Yleisesti anaerobisia olosuhteita käytetään, kun on tarkoitus hajottaa voimakkaasti halogenoituja epäpuhtauksia. (Bioremediation 2021.)

Aerobinen bioremediaatio käyttää happea elektronin vastaanottajana. Sopivien aerobisten olosuhteiden ja ravintoaineiden ollessa läsnä mikro-organismeilla on mahdollisuus muuntaa useat orgaaniset epäpuhtaudet hiilidioksidiksi, mikrobisolunmassaksi ja vedeksi. Mikro-organismien aerobista aineenvaihduntaa käytetään hyödyksi, kun pyritään hajottamaan hiilivetyjä, kuten maaöljyn hiilivetyjä. Monilla organismeilla on kyky hajottaa hiilivetyjä, jolloin ne

käyttävät hiilivetyjä hiilen ja energian lähteinä ja happea elektronin vastaanottajana. Metallien ionimuotoa on myös mahdollista muuttaa anaerobisilla tekniikoilla, jolloin metallien hapettuneet muodot ja niiden vaikutukset ympäristöön tulee myös ottaa huomioon. (Bioremediation 2021.)

Tyypillisesti aerobista bioremediaatiota käytetään paikoissa, jotka sisältävät ”keskipainoisia” öljytuotteita, kuten esimerkiksi dieselpolttoainetta. Kevyet öljytuotteet, kuten bensiini, usein haihtuvat helposti, joten tästä johtuen ne ovat helpompi poistaa maaperästä muilla tekniikoilla. Raskaiden öljytuotteiden kohdalla hajoaminen kestää yleensä kauemmin, mutta bioremediaatiotekniikat voivat olla silti tehokkaita. (Bioremediation 2021.)

2.1 Klooratut liuottimet

Tetrakloorieteeni (PCE), trikloorieteeni (TCE), 1,2-Dikloorieteeni (DCE) ja vinyylikloridi (VC) kuuluvat kloorattuihin liuottimiin. 1,2- dikloorieteeniä on mahdollista esiintyä kahtena isomeerinä, *trans* ja *cis*-muodossa. Vesiympäristöstä löydetään yleisimmin *cis*-isomeeri. Molemmat isomeerit ovat tyydyttymättömien halogenoitujen hiilivetyjen metaboliitteja, ja ne voivat indikoida vinyylikloridin ja muiden organoklooriyhdisteiden esiintymistä. Kloorattujen liuottimien ominaisuudet on esitetty taulukossa 1.(Ylönen 2005.)

Tetrakloorieteeniä käytetään erilaisissa liimoissa sekä rasvanpoisto- ja puhdistusaineena metalliteollisuudessa. Pesuloissa sitä käytetään vaatteiden, turkisten ja kankaiden kemialliseen pesuun. Trikloorieteeniä käytetään yleisimmin teollisuudessa metallin rasvanpoistotoimenpiteissä ja kuivapesutoimenpiteissä, mutta sen käyttö on vähentynyt huomattavasti 1970-luvulta lähtien teollistuneissa maissa. Sitä pääsee vapautumaan ilmakehään ja se voi päästä pinta- ja pohjavesiin erilaisten teollisuusjätteiden mukana. (Ylönen 2005.) Vinyylikloridia käytetään teollisuudessa PVC-muovin ja -hartsien valmistukseen ja vinyylideenikloridin valmistuksessa (OVA-ohjeet 2020).

Taulukko 1. Kloorattujen liuottimien ominaisuudet (OVA-ohjeet 2020)

	Kiehumispiste	Vesiliukoisuus	Tiheys	Rakenne- kaava
PCE	121°C	150mg/l 25°C:ssa	1,6 kg/dm ³	Cl ₂ C=CCl ₂
TCE	87°C	0,1g/100ml 20°C:ssa	1465 kg/m ³	ClHC=CCl ₂
DCE	55°C	6,3 g/l 25°C:ssa	1,28 g/cm ³	ClCH=CHCl
VC	-14°C	1,1 g/l	0.91 kg/dm ³	CH ₂ =CHCl

Pintamaasta tetrakloorieteeni haihtuu nopeasti. Sen pääseminen pohjaveteen on mahdollista, koska se on maaperän laadusta riippuen kohtalaisesti tai helposti kulkeutuvaa. Aerobisissa olosuhteissa sen biologinen hajoaminen on hidasta, mutta anaerobisissa olosuhteissa hajoaminen voi olla nopeampaa. Maaperässä puoliintumisajaksi on arvioitu puolesta vuodesta vuoteen. (OVA-ohjeet 2020.)

Maan pintakerroksissa tetra- ja trikloorieteeni saattavat haihtua tai fotolysoitua. Pääasiassa ne kuitenkin pysyvät maavedessä ja liikkuvat virtauksien mukana. Ne pyrkivät maavedessä jakautumaan tasaisesti diffuusion vaikutuksesta ja vettä raskaampana vajoavat pohjavesiä kohti. Vähähappisessa maaja pohjavedessä ne eivät pääse hajoamaan täydellisesti, vaan mikrobiologisina hajoamistuotteina syntyy cis-1,2-dikloorieteeniä ja vinyylidikloridia. (OVA-ohjeet 2020.)

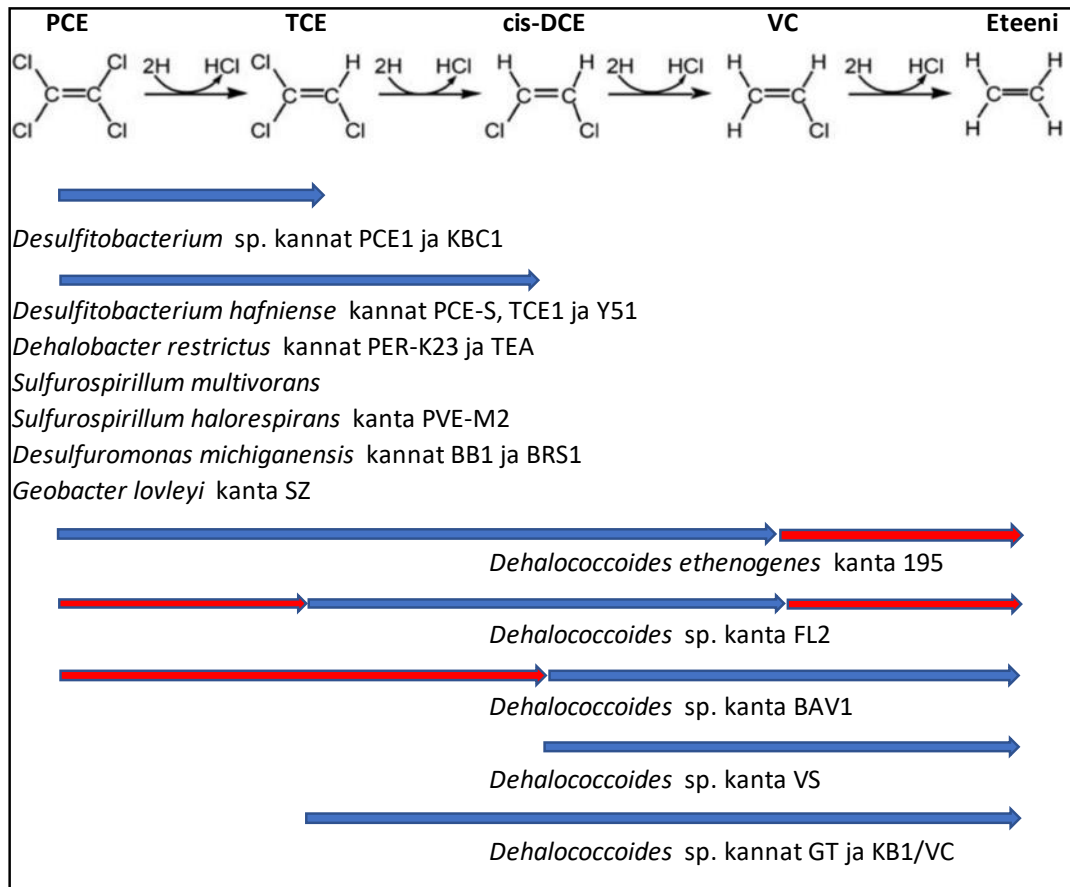
Ilmassa vinyylidikloridi hajoaa hydroksyyli-radikaalien vaikutuksesta ja sen määrä puoliintuu parissa vuorokaudessa. Maahan joutuessaan se haihtuu nopeasti ja puoliintumisajaksi on laskettu 5–12 tuntia. Maaperässä se on kohtalaisen hitaasti tai hitaasti hajoavaa ja sen biologisen hajoamisen puoliintumisajaksi on aerobisissa olosuhteissa arvioitu kuukaudesta vuoteen. Ympäristön kannalta vinyylidikloridi on veteen hyvin liukenevaa ja se on lievästi myrkyllistä vesieläöille. Sen ei ole kuitenkaan todettu kertyvän ravintoketjuun. (OVA-ohjeet. 2020.)

2.1.1 Stoikometria

Vedyn syntyminen in situ ei takaa sitä, että sitä käytetään pelkästään anaerobiseen dekloraukseen. Tämän takia laboratoriossa tai maaperässä klooratuilla eteeneillä ei ole suoraa stoikometristä suhdetta. Vedyn käytön tehokkuus reduktiivisessä deklorinaatiossa on arvioitu olevan vähäistä, kuitenkin stoikometriset suhteet CAH:n anaerobiselle deklorinaatiolle ovat suotuisia. Mikäli mikro-organismit pystyisivät hyödyntämään 100 % vedystä deklorinaatioreaktiossa, voisi 1 mg vetyä pystyä dekloramaan PCE:tä (21mg), TCE:tä (22 mg), DCE:tä (24 mg) ja VC:tä (31 mg). Tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että vedyn tasainen, hidaskäyttö ja matalan tason vapautuminen fermentaatiossa maksimoi deklorinaatio potentiaalin ja samalla minimoi metanogeenistä kilpailua käytettävissä olevasta vedystä. (The Interstate Technology & Regulatory Council 2008, 17.)

2.2 Dehalorespiraatioon kykenevät bakteerit

Dehalorespiraatioksi kutsutaan prosessia, jossa tietyt bakteerit saavat energiaa ja kykenevät kasvamaan kloorieteenien ollessa pelkistysreaktioiden lopputuotteita. Dehalorespiraatioon kykeneviä bakteereita ovat *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*, *Dehalococcoides*, *Geobacter*, *Desulfuromonas* ja *Sulphurospirillum*. Edellä mainittujen bakteerien kannat voivat käyttää PCE:tä tai TCE:tä elektronin vastaanottajana, mutta ne eivät voi täysin deklorata *cis*-DCE:tä VC:tä eteeniksi. Vain *Dehalococcoides* suvun bakteerit (kuva 1) tiedetään pystyvän pelkistävästi dekloramaan *cis*-DCE:n tai VC:n eteeniksi. (Futagami ym. 2008.)



Kuva 1. Kloorieteeniä pelkistävät mikrobit ja kannat. Punaiset nuolet tarkoittavat kometabolista deklorinaatiota (Futagami ym. 2008)

Dehalococcoides bakteerit (taulukko 2) ovat hitaita kasvamaan ja tarvitsevatkin välttämättömiä ravintoaineita kasvaakseen. Vetyä elektronin luovuttajaksi, asetaattia hiilen lähteeksi, kloorattuja ja bromattuja yhdisteitä elektronien vastaanottajaksi ja B12-vitamiinia kasvaakseen. Deklooraavat bakteeriyhteisöt sisältävät yleensä muitakin mikrobeita, jotka ovat kykeneviä fermentoimaan orgaaniset substraatit vedyksi ja asetaatiksi. Näitä bakteereja ovat mm. *Acetobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Spirochaetes* ja *Eubacterium*, kuitenkin tärkeimpänä Deklooraus bakteerina on *Dehalococcoides*. Syntrofit *Desulfovibrio* ja *Acetobacterium* on osoitettu helpottavan *D. mccartyi* 195 kasvua ja kloorinpoistoaktiivisuutta fermentoimalla laktaattia asetaatiksi ja vedyksi, sekä avustavan B12-vitamiinin biosynteesissä. (Miura ym 2015.)

Taulukko 2. Dehalococcodes mccartyi kannat, niiden päätuotteet ja kometabolian tuotteet (Moo-Young ym. 2019)

Kanta	Metabolisesti klooratut eteenit	Päätuote	kometabolian tuotteet
195	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	trans-DCE, VC	trans-DCE, VC
CBDB1	PCE, TCE	trans-DCE (cis-DCE)	-
BAV1	cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, VC	Eteeni	PCE, TCE
VS	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, VC	Eteeni	-
FL2	TCE, cis-DCE, trans-DCE	VS, Eteeni	PCE, VC
GT	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, VC	ETH	-
MB	PCE, TCE	cis-DCE, trans-DCE	-
ANAS1	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	VC, Eteeni	VC
ANAS2	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, VC	Eteeni	-
BTF08	PCE, TCE, VC	Eteeni	-
DCMB5	PCE	TCE	-
11a	TCE	Eteeni	-
11a5	PCE, TCE, cis-DCE	Eteeni	-
UCH007	TCE, cis-DCE, VC	Eteeni	-
JNA	PCE	cis-DCE, trans-DCE	-

Vaikka *Dehalococcoides*in läsnäololla usein viitataan niiden kykyyn hajottaa klooratut eteenit kokonaan eteeniksi, ei kuitenkaan kaikilla sen kannoilla ole samoja hajottamisominaisuuksia. Esimerkiksi tunnetuin kanta 195 saa energiaa vain kolmesta ensimmäisestä kloorausvaiheesta, mutta sen on mahdollista muuttaa VC:n eteeniksi kometabolian kautta. Tästä johtuen VC:n muuttumisnopeus eteeniksi on huomattavasti hitaampi kuin muut vaiheet.

2.2.1 Kasvuedellytykset

Tutkijat ovat todenneet vedyn luovuttamisen olevan tärkeässä roolissa anaerobisessa deklorinaatiossa. On myös todettu, että *Dehalococcoides* vaatii symbioottista yhteyttä muiden mikrobien kanssa, jotta kasvuun vaadittavat vety ja välttämättömät ravintoaineet saadaan. Jotta *Dehalococcoides* bakteerien kantaa saataisiin ylläpidettyä, tulisi se sekoittaa ainakin yhden erillisen bakteerikannan kanssa, joka pystyy fermentoimaan orgaanista substraattia ja tätä kautta tuottamaan vetyä anaerobiseen deklorinaatioon. Anaerobisissa olosuhteissa moni mikro-organismi pystyy fermentoimaan orgaanista ainetta vedyksi. Tästä johtuen melkein mikä tahansa fermentoituva substraatti saattaa olla potentiaalinen vedyn ja hiilen lähde, kun halutaan stimuloida reduktiivista deklorinaatiota. (The Interstate Technology & Regulatory Council 2008, 16.)

Sopivaa substraattia valittaessa tulisi ottaa huomioon myös muut elektronien vastaanottajat, jotka kilpailevat kloorattujen liuottimien kanssa ja samalla estävät tehokasta deklorinaatiota. Fermentoituvien organismien tuottama vety on nopeasti kulutettu liuenneen hapen, nitraattien, sulfaattien, raudan, mangaanin, metanogeenien ja deklorinoivien mikro-organismien toimesta. Jotta reduktiivinen deklorinaatio tapahtuu, on deklorinoivien organismien pystyttävä kilpailemaan vedystä. (The Interstate Technology & Regulatory Council 2008, 17.)

Mikrobien kasvu ja deklorinaatio tapahtuvat pH:n ollessa 6 – 8. Kuitenkin korkein aktiivisuus on mitattu tapahtuvan pH:n ollessa 6.9 – 7.5. Happamissa olosuhteissa olevan *Dehalococcoides mccartyi* pystyy kuitenkin palauttamaan deklorinaatioaktiivisuuden ja kasvumahdollisuudet, kun pH palautetaan neut-

raaliin. Tässä tilanteessa deklorinaatioaktiivisuus vinyylidikloridista eteeniin kuitenkin heikentyy. Lämpötilan vaikutuksia on myös tutkittu välillä 4-45°C. Optimaalisen kasvun on todettu tapahtuvan lämpötilan ollessa 30-34°C. (Moo-Young ym 2019.)

2.3 Metanogeenit

Metanogeenit ovat anaerobisia bakteereita, joilla on kyky pelkistää hiilidioksidi metaaniksi. Useat metanogeenit käyttävät vetyä elektroninluovuttajana ja näin vähentävät samalla hiilidioksidia. Näitä kyseisiä bakteereita kutsutaan autotrofiksi, koska ne voivat käyttää epäorgaanista elektroninluovuttajaa tai -vastaanottajaa aineenvaihduntaan. Joillakin metanogeenillä on myös kyky pelkistää hiilimonoksidia, formaattia, metanolia, erilaisia amiineja ja asetaattia metaaniksi. Monet metanogeeniset elektroninvastanottajat tuotetaan reduktiivisessa deklorinaatiossa fermentoitumisen aikana. (ARCADIS G&M 2002, 8.)

Metanogeenit pystyvät myös hajottamaan kloorattuja alifaattisia hiilivety-yhdisteitä, vaikkakin bakteeri ei tästä prosessista saa mitään metabolista hyötyä. Tällaista satunnaista hajoamista kutsutaan kometaboliaksi. Jokaisen reduktiivisen deklorinaation seurauksena kloridi-ioni vapautuu ja näin muodostuu vähemmän kloorattua tytärtuotetta. Kometaboliseen deklorinaatioon kykeneviä lajeja ovat *Methanosercina mazei*, joka voi dekloorata PCE:n TCE:ksi, sekä *Methanobacterium thermoautotrophicum* ja *methanotherix soehngeniei*, jotka molemmat kykenevät pelkistämään *cis*-DCE:n kloorieteniksi. (ARCADIS G&M 2002, 8.)

2.4 Substraattityypit

Reduktiivisen deklorinaation stimuloimiseksi on käytetty monia erilaisia substraatteja. Nämä substraatit ovat yleensä liukenevia, hitaasti liukenevia tai kiinteitä orgaanisia substraatteja. Liukeneviin substraatteihin luetaan yleensä mukaan lyhytketjuiset rasvahapot ja hiilihydraatit, jotka yleensä liuotetaan veteen ja tämän jälkeen imeytetään kunnostettavalle alueelle. Kyseisten substraattien suuri liukoisuus saa ne siirtymään pohjaveteen ja tämä mahdollistaa niiden helpon jakautumisen erilaisiin ympäristöihin. Nämä substraatit voivat kuitenkin kulua nopeasti. Nopean kuluminen johtuu niiden nopeasta

biohajoavuudesta ja reagoimisesta pohjaveden epäpuhtauksien kanssa.

Tämä lisää käyttö- ja ylläpitokustannuksia, koska nopeasti vetyä vapauttavia substraatteja on usein syytä lisätä pohjavesikerrokseen uudestaan. Kiinteät substraattit (esim. kuorikkeet ja komposti), joiden oletetaan kestävän kauemmin maaperässä, voidaan usein asentaa esim. kaivamalla. Hitaasti liukenevat nestemäiset substraattit, kuten ruokaöljyt, eivät pääse helposti kulkeutumaan pohjaveden mukana ja näin ollen tarjoavat pidempi kestoisen substraatin reduktiiviselle deklorinaatiolle. (Long & Borden 2006.)

Substraattit valitaankin laajasta valikoimasta, jotka ovat yleensä edullisia ja elintarvikelaatuisia tuotteita, kuten melassi, maissisiirappi, hera ja kasviöljyt. Vähemmän monimutkaiset substraattit, kuten butyraatti, laktaatti ja etanoli voivat olla kyseessä, kun halutaan tietää tarkemmin maaperässä tapahtuvat käymisreaktiot. Pienimolekyylipainoisten happojen, kuten butyraatin ja propionaa-tin muodostuminen on yleistä substraattien hajoamisreaktioissa. Näin ollen ne ovat yhtä tärkeitä kuin muut substraattit, kun mietitään vedyn muodostumista ja anaerobisen deklloorauksen stimuloimista. (...Solvents 2004. 1-14.)

2.4.1 Liukoiset substraattit

Liukoiset substraattit (taulukko 3) liikkuvat pohjaveden virtauksen mukana, joten liuenneena tai vesipitoisessa muodossa levitetyillä substraateilla on paras potentiaali jakautua tasaisesti pohjavesimatriisiin verraten viskoosisiin neste-tai kiinteisiin faaseihin. (...Solvents 2004. 1-14.)

Melassi ja natriumlaktaatti ovat yleisimmät liukoiset substraattit, vaikkakin käytössä on myös muita liukoisia substraatteja, kuten metanoli, etanoli, natriumbentsoaatti ja butyraatti.

Taulukko 3. Liukoisten substraattien injektoitavat pitoisuudet, injektointi taajuus ja elinikä. (...Solvents 2004. 5-16,5-17.)

Substraatti	Injektointi muoto ja pitoisuus	Pitoisuus	Injektointi taajuus	Elinikä

Metanoli	Laimennettu 3-30 prosenttiin painosta	50-300 mg/L	jatkuva tai viikkoittainen	1-7 päivää
Etanoli	Laimennettu 3-30 prosenttiin painosta	50-300 mg/L	jatkuva tai viikkoittainen	1-7 päivää
Melassi	Laimennettu 1-10 prosenttiin painosta	50-500 mg/L	päivittäisestä kolmeen kuukauteen	7-90 päivää
Natriumlaktaatti, Kaliumlaktaatti, Maitohappo	Laimennettu 3-30 prosenttiin painosta	50-300 mg/L	jatkuva tai kahden kuukauden välein	7-60 päivää
Butyraatti	Laimennettu 3-30 prosenttiin painosta	50-300 mg/L	jatkuva tai kahden kuukauden välein	7-60 päivää
Korkeafruktoosinen maisisiirappi	Laimennettu 1-10 prosenttiin painosta	50-500 mg/L	päivittäisestä kolmeen kuukauteen	7-90 päivää

Laktaatin käyttö on myös suhteellisen yksinkertaista, koska sitä on saatavana laktaattisuolojen muodossa. Tyypillinen konsentraatio laktaattisuoloille on vedessä 3-30 prosenttia, mutta jopa 60 prosentin seoksiakin on käytetty. Melassi koostuu pääasiassa sokereista, mutta se saattaa sisältää muita ainesosia pieninä pitoisuuksina, kuten rikkiä, sulfaattia ja metalleja, jotka saattavat olla vaarallisia. Tyypillisesti melassi injektoidaan veteen liuoksena, jossa sen pitoisuus on 10 prosenttia melassia tai vähemmän. (...Solvents 2004. 5-20.)

2.4.2 Viskoosiset substraatit

Viskoosit nesteet (taulukko 4) ovat pitkäikäisiä substraatteja, joita ovat mm. HRC® ja raat kasviöljyt. Niiden on tarkoitus olla suhteellisen liikkumattomia maaperässä ja leviäminen sekä kulkeutuminen perustuu yhdisteiden dispersioon ja advektioon. Näin saadaan tehokas kulkeutuminen koko pohjavesimat- riisiin läpi. (...Solvents 2004, 1-14.)

Kasviöljyt ja HRC® (Hydrogen Release Compound) ovat yleisimmät viskoosi- set nesteet, joita käytetään anaerobisen deklorinaation stimuloinnissa. Kun nämä substraatit on injektoitu maanperään, niiden tarkoitus on pysyä liikku- mattomina. (...Solvents 2004, 5-23.)

Taulukko 4. Viskoosisten substraattien injektoitavat pitoisuudet, injektointi taajuus ja elinikä (...Solvents 2004, 5-16,5-17)

Substraatti	Injektointi muoto ja pi- toisuus	Pitoisuus	Injektointi taajuus	Elinikä
HRC®	2- 6 kiloa pystysuun- nassa 30 cm kohden	100-500 mg/L	vuodesta kah- teen vuoteen	9-18 kuu- kautta
Kasviöljy (soi- japapu öljy)	öljy-vesi emulsio 5-15 prosenttia öljyä tilavuu- desta	100-500 mg/L	Kerta injek- tointi. Voi vaa- tia toisen in- jektoinnin, jos kyseessä on erittäin laimea emulsio	2-5 vuotta

Advektion, hajoamisen ja diffuusion seurauksena Kasviöljyjen ja HRC® on kuitenkin mahdollista luoda liikkuvia liukenevia substraatteja. Kyseessä ole- vien substraattien hyötynä pidetään niiden injektointia, jota ei välttämättä tar- vitse tehdä kuin kerran. Ihannelanteessa liuenneen orgaanisen hiilen pitoi- suudet pystytään pitämään yli 100 mg/l pitkiäkin aikoja. Viskoosisten neste- mäisten substraattien huonona puolena pidetään niiden muodostamia uusia

substraatteja, jotka hajoavat helposti. Reaktiovyöhyke ei myöskään yleensä ulotu muutamaa metriä pidemmälle injektiokohdasta. (...Solvents 2004, 5-23.) Jotkut tutkijat ovat tuoneet esille, että runsaasti tyydyttymättömiä rasvahappoja (esim. öljyhappo, linoleenihappo ja linolihappo) sisältäviä ruokaöljyjä on mahdollista käyttää metanogeneesin estämiseen, jonka seurauksena saadaan parempi suorituskyky lisätylle substraatille reduktiivisessä deklorinaatiossa. Tämä perustuu Lalmanin ja Bagleyn työhön, jossa osoitettiin, että yli 30 mg/L öljyhappoa tai linolihappoa estää metaanin tuotannon etikkahaposta. Substraatin käyttöikä olisi mahdollista lisätä käyttämällä hydrattua öljyä, kuten esimerkiksi rasvaa, jolla on alhainen vesiliukoisuus ja korkea sulamispiste. Ei ole kuitenkaan pystytty todistamaan sitä, että runsaasti tyydyttymättömiä rasvoja sisältävien öljyjen käyttö estäisi in situ- olosuhteissa metanogeneesiä merkittävästi. (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 16.)

Yleensä tehostetussa bioremediaatiossa emulgointiaineena käytetään elintarvikelaatuista lesitiiniä, polysorbaatteja, mono- ja diglyseridejä, glyserolimonooleaattia tai jotakin näiden yhdistelmää. Nopeasti hajoavaa liukoista substraattia, kuten laktaattia, on yleistä sekoittaa emulsioon pohjavesikerroksen kunnostamiseksi ja luomaan nopeammin pelkistävät olosuhteet. Jos maaperä sisältää vähän orgaanista hiiltä tai savipitoisuus on vähäinen, lesitiini- ja soijaöljyemulsiot voivat olla sopivia johtuen niiden kyvystä kiinnittyä hiekkaiseen pohjavesikerrokseen. Kokemuksien mukaan lesitiiniä tulisi käyttää vain niin paljon, mitä vaaditaan luomaan vakaa emulsio. Tyypillisesti vakaassa emulsiossa lesitiiniä on alle 5-10 prosenttia öljyssä. Tällä pystytään estämään ei-toivottua laskua hydraulisessa johtavuudessa. Polysorbaatti tai glyserolimonooleaatti voivat olla sopivia emulgointiaineita, kun kyseessä on maaperä, joka sisältää paljon savea. (...Solvents 2004, 5-26.)

Matalan viskositeetin nesteitä on myös kehitetty parantamaan substraatin jakautumista maaperään, samalla kun se tarjoaa pitkäaikaisen orgaanisen hiilen lähteen. Mikroemulsiot, jotka sisältävät 5–10 prosenttia kasviöljyä vedessä ovat suhteellisen matalan viskositeetin seoksia, jos verrataan aikaisemmin kuvattuihin viskoosisiin nesteisiin. (...Solvents 2004, 1-15.)

Kun valitaan oikeata öljytyyppiä, ei voida olettaa, että yksi öljytyyppi soveltuisi paremmin anaerobiselle bioremediaatiolle kun mikään muu öljy. Eensisijaisesti tulisi ottaa huomioon kustannukset, saatavuus ja materiaalinkäsittelyominaisuudet. (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 17.)

2.4.3 Kiinteät substraatit

Anaerobisen deklorinaation stimuloimiseksi käytettäviä kiinteitä substraatteja ovat esim. kate, komposti ja myös erilaiset maatalouden sivutuotteet, kuten puuvillan siemenkuoret. Katetta saadaan yleensä pensaiden ja puiden leikkaamisesta ja hakkeesta. Se koostuu pääasiassa ligniinistä ja selluloosasta. Usein käytetään myös vihreää kasvimateriaalia tai kompostia, jotta mikrobeille saadaan typen lähde ja helposti hajoavaa orgaanista hiiltä. Substraatin hajoaminen mikrobien toimesta saa aikaan hajoamistuotteita, kuten aineenvaihdunnalliset ja humuspitoiset hapot, jotka toimivat toissijaisina käymissubstraatteina. Tavanomaisesti kiinteät substraatit sijoitetaan kaivoihin tai kaivauksiin täytteenä, joka suoritetaan vain kerran. (...Solvents 2004, 1-16.)

Taulukko 5. Kiinteiden substraattien injektoitavat pitoisuudet, injektointi taajuus ja elinikä (...Solvents 2004, 5-16,5-17)

Substraatti	Injektointi muoto ja pitoisuus	Pitoisuus	Injektointi taajuus	Elinikä
Kate ja komposti (selluloosa)	Sekoitetaan hiekkaan, jolloin katetta tai kompostia on 20-60 prosenttia tilavuudesta	100-1000 mg/L orgaanista hiiltä bioseinämän reaktio vyöhykkeellä	Kerta-asennus	Ei tarkkaa tietoa. Epäilty kestävän yli 5 vuotta

Kiinteiden substraattien tarkoitus on olla pitkäaikaisia hiilen lähteitä, joiden arvioitu elinikä on yli 5-10 vuotta. (Principles and Practitices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents 2004. 5-27.)

2.4.4 Kokeelliset substraatit

Kun puhutaan kokeellisista substraateista, on kyseessä orgaanisia substraatteja, joilla on mahdollisesti tehty jo muutama kenttätestaus ja joiden suorituskykyä arvioidaan parhaillaan. Näitä substraatteja ovat kitiini, vetykaasu ja hera. On myös tunnistettu muitakin potentiaalisia substraatteja, joita ei ole vielä kentällä välttämättä testattu, kuten maito, jauhot, laktoosi, oleaatti ja tetraabutyylifosfaatti. Mikrobikasvulla tuotetun biomassan on myös laboratoriossa todettu sopivan toissijaisena substraattina anaerobiseen reduktiiviseen deklorinaatioon. (...Solvents 2004, 1-16.)

Taulukko 6. Kokeellisten substraattien injektoitavat pitoisuudet, injektointi taajuus ja elinikä (...Solvents 2004, 5-16,5-17)

Substraatti	Injektointi muoto ja pitoisuus	Pitoisuus	Injektointi taajuus	Elinikä
Hera	Jauhe muoto voi olla liuotettu ja tuore muoto voidaan injektoida lietteenä	50-500 mg/L	kuukausittaisesta vuoteen	1-12 kuukautta
Kitiini	Injektoidaan jauhemaisessa muodossa tai kokonaisessa muodossa kaivantoihin	100-500 mg/L	Kerta injektointi/asennus	Ei tarkkaa tietoa. Epäilty kestävän yli 5 vuotta
Vetykaasu	Puhtaana vetykaasuna tai tyyppiä sisältävissä vähemmän		jatkuva tai viikoittainen	1-7 päivää

	haihtuvissa seoksissa.			
--	------------------------	--	--	--

Tutkimusten tulokset ovat osoittaneet, että myös rapujen kuorien käyttö elektroninluovuttajana on mahdollista. Niissä voi olla myös useita etuja verrattuna tavanomaiseen nestemäiseen elektroninluovuttajaan, kun kyseessä on kloorattujen eteenien in situ bioremediaatio. Kitiini tarjoaa lukuisia elektroninluovuttajia ja ravinteita, jotka mahdollistavat useiden epäpuhtauksien käsittelyn. Kitiini myös hajoaa hitaasti, jonka seurauksena se voi kestää huomattavasti kauemmin ennen kuin se tarvitsee vaihtoa. (Brennan ym. 2006.)

On myös saatavilla useita eri laatuja pääosin kitiiniä sisältäviä kiinteitä substraatteja, jotka myös omaavat samankaltaiset ominaisuudet kuin kate ja komposti. Kitiinin on myös havaittu stimuloivan tehokkaasti anaerobista deklloorinaatiota. Kitiini voi omata yhtenäisemmän koostumuksen ja sen hajoamisominaisuudet ovat paremmin ennustettavissa, kun taas katteessa ja kompostissa ne voivat olla hyvinkin vaihtelevia. Kun verrataan katteeseen ja kompostiin, on kitiinillä kuitenkin huomattavasti korkeammat kustannukset, eikä se välttämättä kestä maaperässä yhtä kauan. (...Solvents 2004, 5-29.)

Kemiallisesti ehkä kaikkein monimutkaisin liukoisista hiilihydraateista on juustohera. Monimutkaisen rakenteen ansioista hera voi mahdollistaa pidempään kestäväen substraatin kuin yksinkertaiset substraatit, kuten etanoli ja laktaatti. Tuoretta heraa saadaan meijeriteollisuuden sivutuotteena ja sitä on mahdollista saada hyvin edullisesti. Myös helpommin hankittavissa, lähetettävissä ja varastoitavissa olevaa herajauhetta on mahdollista käyttää, mutta se on kalliimpaa. Tutkimuksissa heraa on sekoitettu yhteen korkeafruktoosisen maissi-siirapin kanssa, jolloin seoksen elinikä on saatu pidennettyä 12 kuukauteen. (...Solvents 2004, 5-29.)

Meijeriteollisuudessa käytetään ultra- ja nanosuodatuksen (NF) yhdistelmää, jolla maidosta ja herasta poistetaan laktoosi (DSS 2003). Suodatuksessa kalvon läpäisevää virtaa kutsutaan permeaatiksi ja kalvon pidättämää virtaa re-

tentaatiksi. Maidon ultrasuodatuksessa syntyvä permeaatti sisältää pääasiassa laktoosia ja kivennäisaineita (Kalvosuodatus s.a.). Nanosuodatuksessa syntyvän NF-retentaatin kuiva-ainepitoisuus on 20-24%, josta laktoosin pitoisuus on noin 90% (Tossavainen & Sahlstein 2005).

Soluneste otetaan talteen perunatärkkelyksen valmistuksessa. Se sisältää suuren osan pää- ja hivenravinteita, jota peruna ottaa maaperästä. Tuotantolaitoksen prosessityyppi ja perunan kasvuolosuhteet tietyssä määrin vaikuttavat solunesteen ravinnepitoisuuksiin. Fosforin, kaliumin ja typen lisäksi soluneste sisältää myös jonkin verran magnesiumia ja kalsiumia. Suomalaisilta laitoksilta saatavan solunesteen kuiva-ainepitoisuus on noin 43 g/l ja COD 54 g/l. (Pääkkönen ym. 2004, 21.) Vuonna 2014 soluneste on ollut painonsa puolelta suurimpia sivuvirtoja (74880.4 t/v). Ravinnerikas soluneste ohjautuu lähes kokonaan maaperän käsittelyyn, koska se soveltuu hyvin sellaisenaan lannoitteeksi luomuviljelyyn ja kaikille kasveille (Berg 2016, 6,16).

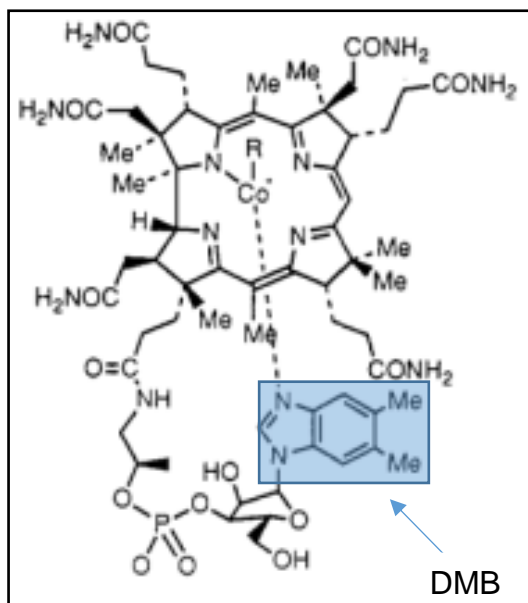
2.5 Substraattien ja niiden sisältämien komponenttien optimaaliset pitoisuudet

2.5.1 B12- vitamiini

B12-vitamiinin on todettu olevan keskeisessä roolissa *D. mccartyi* bakteerien kasvussa ja deklorinaatioaktiivisuudessa. Tähän liittyen on tehty laboratoriotestejä, jolla on voitu selvittää *Dehalococcoides* bakteerien tarvitsema optimaalinen B12-vitamiinien tarve, jolla saavutetaan suurin mahdollinen deklorinaatioaktiivisuus ja kasvu. (He ym. 2007, 3.)

Viljelmillä, jotka sisälsivät B12 vitamiinia 0.001 mg/l saavutettiin vain keskinertainen TCE deklorinaatioaktiivisuus. Kun B12-vitamiinin pitoisuutta lisättiin 25 kertaiseksi, jolloin pitoisuus oli 0.025 mg/l TCE:n deklorinaatioaktiivisuus kaksinkertaistui ja viimeisen vaiheen vinyylikloridista etaaniin reaktion aktiivisuus kasvoi. Kun B12-vitamiinin pitoisuutta viljelmissä on vielä nostettu, deklorinaatioaktiivisuus ei ole kasvanut. (He ym. 2007, 3.)

Monimutkaisesta kemiallisesta luonteestaan johtuen kobalamiinin koko de novo biosynteesille tarvitaan yli 30 geeniä, joiden määrä on noin 1 prosentti tyypillisestä bakteerigenomista. Luonnossa B12-vitamiinille esiintyy kaksi erilaista biosynteettistä reittiä: (1) aerobinen tai tarkemmin hapesta riippuvainen reitti ja (2) anaerobinen, hapesta riippumaton reitti. (Fang ym. 2017.)

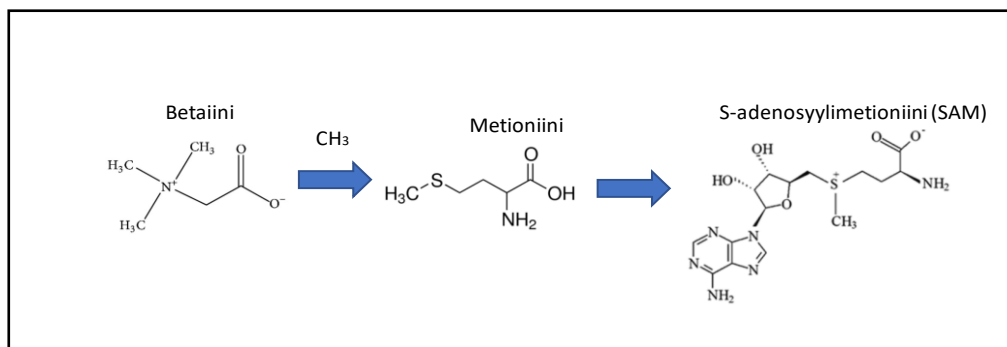


Kuva 2. B12-Vitamiinin rakenne (Battersby 1993)

B12-vitamiinin biosynteettisen reitin esiasteiden lisääminen, kuten ALA:n, DMB:n, koboltti-ionien, glysiinin, treoniinin tai yhteensopivien liuenneiden aineiden, kuten koliinin ja betaiinin on usein todettu olevan suotuisaa (Fang ym. 2017). δ -aminolevulinaatti (ALA) on ei-proteiiniaminohappo, jota esiintyy laajasti sienissä, bakteereissa, kasveissa ja eläimissä. Bioteknologiassa ALA:lla on tärkeä rooli hemiä sisältävässä entsyymintuotannossa, porfyriinin tuotannossa ja B12-vitamiinin tuotannossa (Kang ym. 2012).

B12-vitamiinin viljelyprosessin sivutuotteena syntyy propionihappoa, jonka tuottaa *P. freudenreichii*. *P. freudenreichii*:n tuottama propionihappo estää mikrobisolujen kasvua ja tämän ongelman ratkaisemiseksi on käytetty *Propiobacterium*:n ja *Ralstonia eutrophan* sekoitettua viljelmää. Metioniinin muodostukseen tarvitaan betaiinia, joka luovuttaa metyyliryhmän. Metioniini muuttuu edelleen SAM:ksi (kuva 4), johtuen metioniinadenosyyliitransferaasin aktiivisuudesta. S-adenosyyliimetioniini on tärkeä esiaste korinoidirenkaan muodos-

tumisen aikana. Vaikka betaiini hidastaa solujen kasvua, betaiinin syötön fermentaation aikana on todettu lisäävän B12-vitamiinin tuotantoa. (Fang ym. 2017.)



Kuva 4. SAM:n muodostumisen vaiheet (Fang ym. 2017)

Kuten jo aikaisemmin mainittiin *Propionibacterium freudenreichii* fermentoitumisen seurauksena saadaan tuotettua B12-vitamiinia, mutta syntyy myös muitakin tuotteita kuten propionihappoa ja etikkahappoa. Näillä hapoilla on kuitenkin negatiivinen vaikutus solujen kasvuun ja näin ollen B12-vitamiinin tuotantoon. Propionibakteerit pystyvät tuottamaan B12-vitamiinia useista eri hiililähteistä, kuten sakkaroosista, tomaattien puristeesta, melassista, glyserolista ja kotitaloussokerista. (Fang ym. 2017.)

B12-vitamiinin saannon lisäämiseksi on tehty monia tutkimuksia, joissa on pyritty optimoimaan kasvatusliuoksen koostumusta ja viljelyprosessia. Kahtaisioisella betaiinilla on kriittinen rooli osmoregulaatiossa ja metioniinisynteesissä. *P. denitrificans* bakteertin avulla metioniini voitaisiin syntetisoida homokysteiniinistä betaiinin kanssa metyylyiryhmän luovuttajana. B12-vitamiinin tuotantoa viljelyprosessissa on myös mahdollista parantaa kontrolloimalla liuoksen hapen määrää. (Fang ym. 2017.)

Taulukko 7. Anaerobisten mikrobien tuottama B12-vitamiinin määrä (Fang ym. 2017)

Anaerobiset kannat	Pääsubstraatit	B12 vitamiini
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Maitohappo	1,7 mg/L
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Metanoli	3,6 mg/L

<i>P. shermanii</i>	Glukoosi, DMBI (5,6-dimethyl-benzimidazole)	60,0 mg/L
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	Glukoosi, DMBI	135,0 mg/L
<i>P. freudenreichii</i>	Glukoosi, DMBI	206,0 mg/L

B12-vitamiinin teollisuustuotanto tapahtuu fermentoimalla, jossa pääasiassa käytetään *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas denitrificans* tai *Sinorhizobium meliloti* bakteereita (taulukko 7). Viime aikoina huomio on kuitenkin kiinnittynyt B12- vitamiinin tuotantoon *Escherichia coli*:a käyttäen. *E.colia* on käytetty laajasti erilaisten kemikaalien, kuten terpenoidien, polylaktaatin, polyglykolaatin ja ei-luonnostaan esiintyvien alkoholien valmistukseen. (Fang ym. 2017.)

2.5.2 Koboltti

Tutkimuksissa on havaittu, että 5 µg/ml kobolttia on riittävä määrä tuottamaan 15 µg/ml B12- vitamiinia *P. freudenreichii*- kannan avulla, kun käytetään heraväliainetta. Kun koboltin määrää on kasvatettu yli 5 µg/ml, ei B12-vitamiinin tuotto ole kasvanut. Koboltin luonnollinen pitoisuus elintarvikkeissa on kuitenkin alle 5 µg/ml. Esimerkiksi heraväliaineessa B12-vitamiinin tuotanto kasvoi 3-kertaiseksi (440 ng/ml) 5 µg/ml Co- lisäyksen seurauksena, kun taas ilman lisäystä tuotanto oli vain 140 ng/ml. (Chamlagain 2016, 26.)

2.5.3 pH:n muokkaajat ja ravinteet

Kentällä pohjaveden pH-arvoon vaikuttavat paikalliset maaperän fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, sekä organismit ja epäpuhtaudet. Anaerobisen fermentaation aikana tuotetut hapot voivat laskea pH:ta merkittävästi, minkä seurauksena saattaa olla mikrobien kasvun inhiboituminen. (He & Su 2015, 151.)

Puskurointi voidaan toteuttaa käyttämällä yhdisteitä, kuten natriumkarbonaattia (NaHCO_3), kalkkia (CaO), dolomiittistä kalkkia (CaO/MgO) tai magnesiumhydroksidia (Mg(OH)) (Protocol for Bioremediation of Chlorinated Solvents Using Edible Oil 2007, 6-14). HCO_3^- eli bikarbonaatti on luonnollinen puskuri pohjavesissä ja se toimii myös elektronin luovuttajana vetyotrofisille metanogeeneille ja homoasetogeeneille, jotka molemmat kilpailevat vedystä (Delgado ym. 2012).

Normaalisti pohjavesikerros sisältää riittävän määrän ravintoaineita mikrobien kasvuun. Orgaanisen substraatin lisääminen kuitenkin aiheuttaa suurempaa ravintoaineiden kysyntää johtuen mikrobien nopeasta kasvusta, jolloin kysyntä voi ylittää pohjavesikerroksessa olevien ravintoaineiden kapasiteetin. Mikroorganismit tarvitsevat myös helposti hajoavan hiililähteen lisäksi ravintoaineita, kuten fosforia, typpeä ja kaliumia solujen aineenvaihduntaan ja näin ollen kasvuun. Yleisesti käytettyihin ravintoaineisiin kuuluvat mineraalisuolat (kuten KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca(NO}_3)_2$, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgNH_4PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), urea, vedetön ammoniakki ja monia muita kaupallisia epäorgaanisia lannoitteita. (He & Su 2015, 151.)

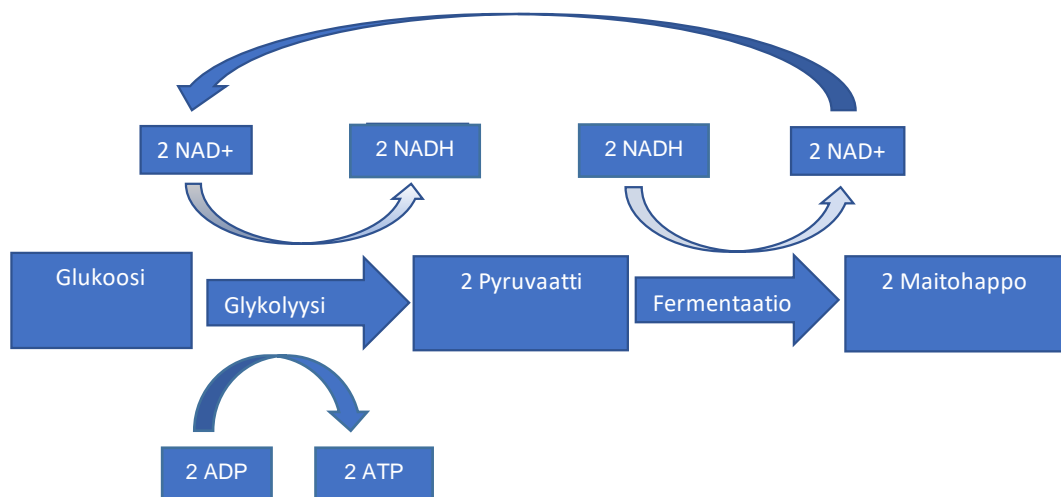
2.6 Fermentoituminen

Fermentaatio on redox-reaktio, jossa toinen osa substraatista hapettuu ja toinen pelkistyy, ja tämän seurauksena saadaan energiaa. Fermentaatio ei tarvitse ulkoista elektronin vastaanottajaa. Elektronin luovuttajana ja elektronin vastaanottajana toimii orgaaninen molekyyli itsessään. Fermentoinnin energiantuotto substraattiyksikköä kohden on huomattavasti pienempää kuin hapetusreaktioissa, joissa käytetään ulkoista elektronin vastaanottajaa. Fermentoinnin on todettu yleensä tapahtuvan, kun ulkoiset elektronin vastaanottajat ovat ehtyneet. (...Solvents 2004, 2-7.)

Fermentoinnissa orgaaniset yhdisteet kuten aminohapot ja sokerit hajotetaan pienemmiksi orgaanisiksi molekyyleiksi, jotka hyväksyvät energianlähteen hajoamisen seurauksena vapautuneet elektronit. Nämä kataboliset reaktiot johtavat suoraan ATP:n muodostumiseen (kuva 5). Kun glukoosi hajotetaan maitohapoksi, jokainen glukoosimolekyyli tuottaa vain kaksi ATP-molekyyliä. Jotta

saadaan tarpeeksi energiaa bakteereiden kasvulle, onkin glukoosia hajotettava huomattava määrä. Johtuen orgaanisten yhdisteiden osittaisesta hapettumisesta fermentaation aikana, fermentoivien bakteerien kasvu johtaa suurten orgaanisten lopputuotteiden määrien tuotantoon ja suhteellisen pieneen energiatuotokseen kulutettua glukoosimolekyyliä kohden. (Rogers s.a.)

Fermentaatio ei kuitenkaan tee ATP:tä, mutta se sallii glykolyysin jatkumisen. Fermentaatio poistaa elektroneja NADH molekyyleistä ja kierrättää NAD⁺ molekyylit glykolyysiin. Jatkuakseen glykolyysi tarvitsee molekyyleja, jotka ottavat vastaan elektroneja. Jos NAD⁺ ei ole ottamassa vastaan korkean energian elektroneja glukoosin hajoamisesta, glykolyysi loppuisi. Kun suuren energian omaavat elektronit otetaan vastaan voi glukoosin ja muiden yksinkertaisten sokereiden hajottaminen jatkua ja näin saadaan pieniä määriä ATP:tä. (Fermentation, 73.)



Kuva 5. Maitohappo fermentaatio (Khan s.a.)

Alkoholi ja maitohappo fermentaatio etenevät lähes samalla kaavalla, mutta alkoholi fermentaation lopputuotteena ei saada maitohappoa, vaan 2 moolia alkoholia ja 2 moolia hiilidioksidia (Khan s.a.).

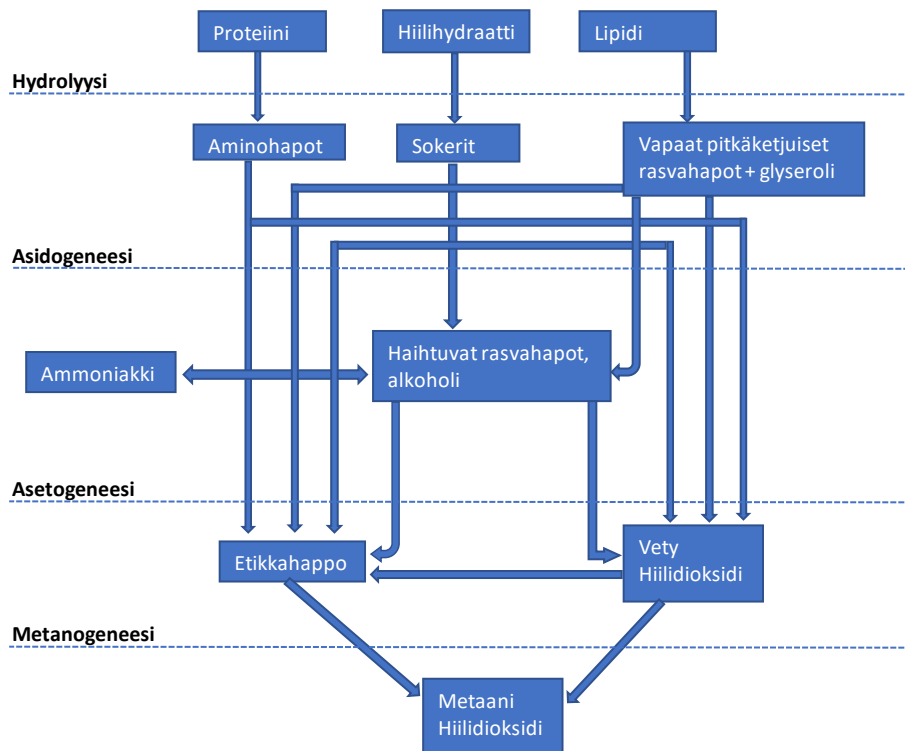
2.6.1 Pimeä fermentaatio

Orgaanisen aineen anaerobista hajotusprosessia kutsutaan pimeäksi fermentaatioksi, koska se ei vaadi valoa ja tapahtuu normaalissa lämpötilassa ja pai-

neessa. Biovetyä tuotettaessa se on tehokkain ja yksinkertaisin tapa verrattuna muihin biologisen vedyn tuotantomenetelmiin. Anaerobinen fermentaatio jaetaan yleensä neljään päävaiheeseen, jotka ovat hydrolyysi, asidogeneesi, asetogeneesi ja metanogeneesi (Hernandez-Maldonado & Blaney 2020, 223).

Koska bakteerit eivät suoraan pysty metaboloimaan hiukasmaista orgaanista materiaalia sen koon vuoksi, ensimmäinen vaihe anaerobisessa hajoamisessa on kiinteiden hiukkasten ja makromolekyylien hydrolyysi. Hydrolyysi tapahtuu bakteereista erittyvien entsyymien vaikutuksesta ja sen seurauksena polymeerihaukkaset liukenevat ja saadaan pienempiä molekyylejä, jotka pääsevät bakteerien solukalvojen läpi. Entsyymien avulla tapahtuvan hydrolyysin aikana lipidit hydrolysoituvat pitkäketjuisiksi rasvahapoiksi, proteiinit aminohapoiksi ja polysakkaridit monomeerisiksi sokereiksi. (Van Haandel & Van der Lubbe 2019, 43.)

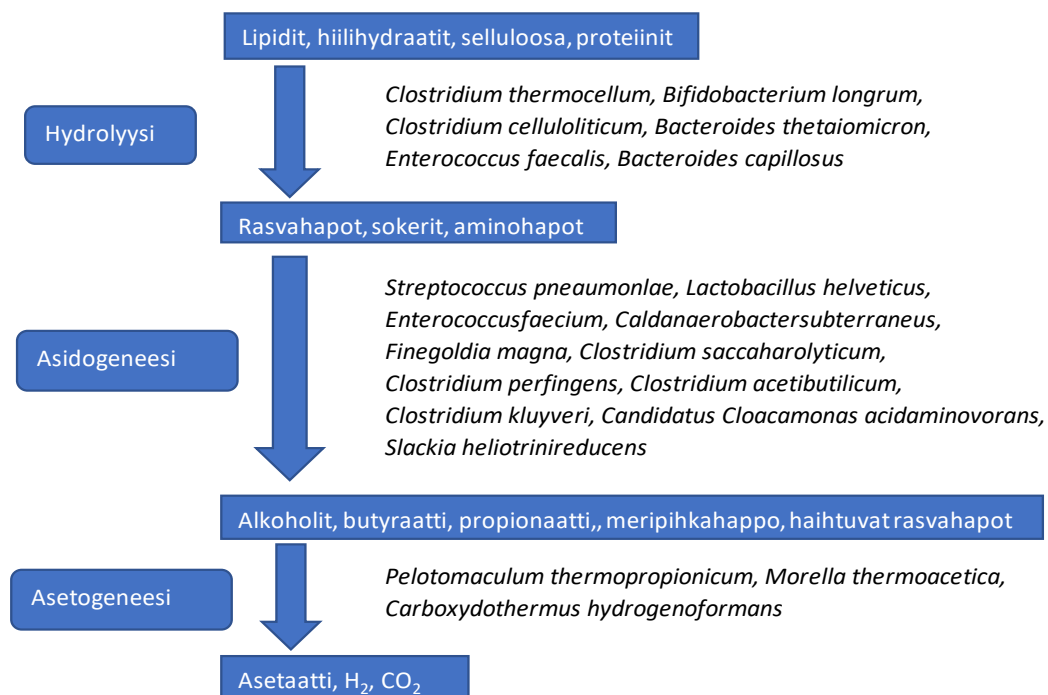
Asidogeneesiprosessin aikana hydrolyysin tuotteet muuttuvat vielä pienemmiksi molekyyleiksi fermentaatioprosesseilla. Asidogeneesi on todella yleinen reaktio ja sen suorittaa laaja joukko hydrolyyttisiä ja ei-hydrolyyttisiä mikro-organismeja. Päätuotteita ovat haihtuvat rasvahapot, jotka ovat lyhytketjuisia karboksyylihappoja. Samaan aikaan muodostuu muitakin orgaanisia ja epäorgaanisia tuotteita, kuten alkoholeja, vetyä, hiilidioksidia, ammoniakkia ja maitohappoa. Asetogeneesivaiheessa asidogeneesin tuotteet muutetaan hiilidoksidiksi, vedyksi ja asetaatiksi. (Van Haandel & Van der Lubbe 2019, 44,46.)



Kuva 6. Anaerobinen hajoaminen anaerobisten bakteerien toimesta (Sabaratnam & Hassan s.a)

Pimeä fermentaatio sisältää kahden tyyppisiä mikro-organismeja, obligaatteja ja fakultatiivisia anaerobeja. Fakultatiiviset anaerobit pystyvät lisääntymään, kun läsnä on pieni määrä happea, mutta pystyvät tuottamaan vetyä vain anaerobisissa olosuhteissa. Obligaatti anaerobit eivät kykene kasvamaan, mikäli läsnä on happea. (De Miranda 2019, 129.)

Fakultatiivisista mikro-organismeista tärkeimpänä vedyntuotannon kannalta pidetään *Enterobacter sp.* bakteereita. *Enterobacter sp.* tuottaa formiaattivety-lyyaasia (FML) tai [FeFe] hydrogenaasientsyymeitä, joiden avulla saadaan korkea vedyn tuotanto ja saanto. (De Miranda 2019, 130.)



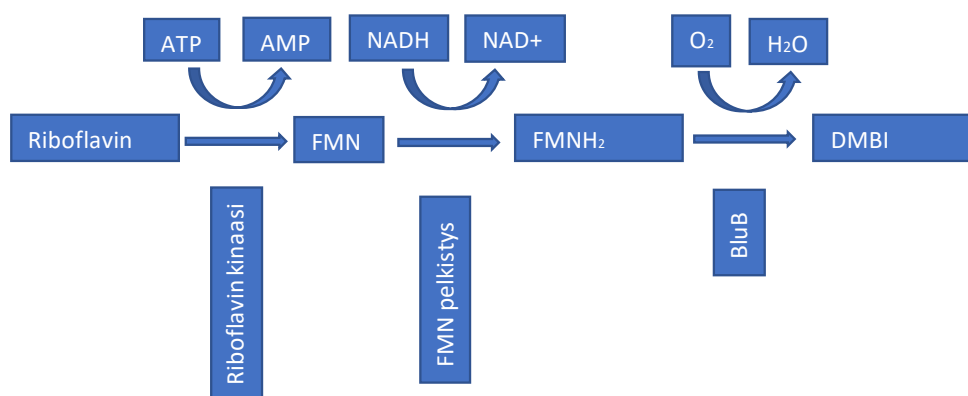
Kuva 7. Anaerobisen fermentaation eri vaiheissa mukana olevat mikrobit (Hernandez-Maldonado & Blaney 2020, 224)

Fakultatiivisiin anaerobeihin verrattuna obligaatit anaerobit ovat tehokkaampia vedyntuottajia. Lisäksi ne voivat käyttää hyväkseen lukuisia hiilihydraatteja ja niiden metabolinen reitti on erilainen. Tunnetuimpia obligaatista anaerobeita vedyntuotannossa ovat *Clostridium* suvun bakteerit (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium acetobutylicum* ja *Clostridium thermolacticum*). (De Miranda 2019, 130.)

Asidogeeniset ja hydrolyyttiset mikro-organismit ovat noin 10 kertaa nopeampia kasvamaan kuin metanogeenit. Nämä mikro-organismit voivat muuntaa hydrolysoituja tuotteita edelleen haihtuviksi rasvahapoiksi (VFA), kuten voi-hapoksi, propionihapoksi, etikkahapoksi ja muurahaishapoksi. Suurin osa näistä hapoista muodostuu glukoosin metaboliassa glykolyyttisen Embden-Meyerhofe-Parnas reitin kautta. (Hernandez-Maldonado & Blaney 2020, 225.)

2.7 Dimetyylibentsimidatsole

Kobalamiini sisältää 5,6-dimetyylibentsimidatsolea alempana ligandina (kuva 2). On pystytty osoittamaan, että jotkut aerobiset mikro-organismit syntetisoivat 5,6-dimetyylibentsimidatsolia riboflaviinista FMN:n kautta. Näitä aerobisia mikro-organismeja ovat mm. *Bacillus megaterium* ja *Prauserella rugosa*, *Salmonella enterica enterica serovar Typhimurium* ja *Propionibacterium*. (Caspi 2007.)



Kuva 8. DMBI: muodostuminen (Chamlagain 2016)

Sinorhizobium meliloti:sta peräsin oleva entsyymi BluB on yksin vastuussa DMBI:n muodostumisesta kun FMN pelkistyy maaperässä bakteeri *Sinorhizobium melilotin* toimesta (kuva 8). Tämä mekanismi, joka tarvitsee molekyyllistä happea, löytyy aerobisista ja aerotoleranteista mikro-organismeista. (Caspi 2007.)

2.8 Maaperässä vedystä kilpailevat elektronin vastaanottajat

Alkuperäiset elektronin vastaanottajat kilpailevat maaperässä mahdollisesta substraatista kloorattujen alifaattisten hiilivetyjen anaerobisessa reduktiivisessa deklorinaatiossa. Kun liuennut happi on ehtynyt, anaerobiset mikrobit käyttävät nitraattia elektronin vastaanottajana, jonka jälkeen mangaania (IV), rautaa (Fe^{3+}) ja sulfaattia ja lopuksi hiilidioksidia. Jotkut elektronin vastaanottajat, kuten liuennut happi, nitraatti ja sulfaatti voidaan mitata suoraan pohjavedestä. (...Solvents 2004, 6-23.)

2.8.1 Liuennut happi

Liuennut happi on termodynaamisesti sopiva elektronin vastaanottaja, jota mikrobit käyttävät orgaanisen hiilen biologiseen hajoamiseen, joko luonnollisesti tai antropogeenisesti. Anaerobiset bakteerit eivät yleensä pysty toimimaan, jos liuennun hapen pitoisuudet ovat suurempia kuin 0.5 mg/L ja näin ollen anaerobinen reduktiivinen deklorinaatio ei tapahdu. Orgaanisen hiilen lähde, kuten erilaiset ruokaöljyt, on tärkeää saada pohjavesikerrokseen, jotta aerobiset mikrobit voivat käyttää niitä ensisijaisena substraattina. Aerobisen respiraation aikana liuennut happi vähenee ja pitoisuudet laskevat. (...Solvents 2004, 6-23.)

2.8.2 Nitraatti

Kun liuennut happi on käytetty käsiteltävällä alueella, voidaan nitraattia käyttää elektronin vastaanottajana anaerobisesti biohajoavalle orgaaniselle hiillelle, ensisijaisesti denitrifikaation kautta. Jotta anaerobinen deklorinaatio olisi tehokasta, tulisi pohjaveden kunnostettavassa osassa nitraattipitoisuuksien olla alle 1 mg/L. (...Solvents 2004, 6-24.)

2.8.3 Rauta (II) ja Mangaani (II)

On tapauksia, jossa orgaanisen hiilen anaerobisen biohajoamisen aikana Fe (III):ta ja mangaani (IV):ta käytetään elektronien vastaanottajina. Tässä prosessissa Fe(III) pelkistetään Fe(II):ksi, joka sitten liukenee veteen. Myös mangaani (IV) pelkistetään liukoiseksi mangaani (II):ksi, jonka jälkeen molempia Fe(II) ja mangaani (II) voidaan käyttää indikaattoreina anaerobiselle biologiselle hajoamiselle. Pitoisuuksien tulkinnassa pitää kuitenkin olla varovainen, koska rauta ja mangaani saostuu samanaikaisesti sulfidien kanssa. (...Solvents 2004, 6-24.)

2.8.4 Sulfaatti

Kun Liuennut happi, nitraatti, mangaani ja rauta on ehtyneet kunnostettavalla alueella, voidaan sulfaattia käyttää elektronin vastaanottajana anaerobisessa

biohajoamisessa. Tätä prosessia kutsutaan sulfaatin pelkistymiseksi ja se johdattaa sulfidin tuotantoon. Mikäli sulfaattipitoisuudet ovat yli 20 mg/L, voi se tarkoittaa, että huomattava määrä substraateista käytetään sulfaatin pelkistykseen. Sulfaattia on pelkistettävä, jotta saavutetaan metanogeeniset olosuhteet, ja korkeat sulfaattipitoisuudet voivat vähentää reduktiivisessa deklorinaatiossa käytettävän substraatin tehoa. (...Solvents 2004, 6-24.)

2.9 Kaupalliset substraatit

Markkinoilla on useita toimijoita, joilla on käytössään heidän itse kehittelemiään substraatteja. Substraatit eroavat toisistaan niiden sisällön ja vaikutusmekanismien perusteella.

Taulukko 8. Kaupalliset substraatit

Substraatin nimi	Valmistaja	Pääsubstraatti	Pitoisuus %	vaikutusaika
ABC	Carus	Glyseroli	45-60	
ELS	Peroxychem	Lesitiini	70-90	
ERD-CH4TM:ERD-CH4TMole'-eGO(+DVI) N	Provectus	Punainen hiivariisiuute	0-50	
ERD-CH4TM:ERD-CH4TMole'-eGO(+DVI)	Provectus	Oleiinihappo	20-50	
3-D MICROEMULSION	Regenesis	Oleiinihappo	40-70	
Newman zone	RNAS	Soijaöljy	>46	
Newman zone 50E	RNAS	Soijaöljy	>50	
Newman zone 55	RNAS	Soijaöljy	>55	
SRS®-FRL	Terra Systems	Soijaöljy	60	
SRS®-SE	Terra Systems	Soijaöljy	90	

Taulukosta 8 voidaan nähdä kasviöljyjen olevan pääsubstraattina useammassa kaupallisessa substraattissa ja niiden pitoisuus vaihtelee suuresti. Suurista kasviöljypitoisuuksista voidaan olettaa substraattien olevan kertainjektotavia substraatteja tai ne on tarkoitus vielä laimentaa. Laimennettavaksi tarkoitettu substraatti todennäköisesti sisältää vielä jotain emulgointiainetta. Kaikki yritykset eivät nettisivuillaan kerro tarkalleen, mitä heidän substraatit sisältävät.

2.10 Substraatin kulutuksen arvioiminen

Substraatin määrä, joka tarvitaan vähentämään kloorattujen alifaattisten hiilivetyjen ja natiivisten elektronien vastaanottajien massaa, voidaan määrittää laskemalla stoikometrinen vedyn tarve liuenneista elektronin vastaanottajista

ja klooratuista alifaattisista hiilivedyistä. Hajoavien haitta-aineiden ja elektronien vastaanottajien massa lasketaan kertomalla keskimääräiset pitoisuudet käsiteltävän pohjaveden tilavuudella. (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 56.)

Taulukko 9. Kloorattujen liuottimien ja elektronin vastaanottajien stoikometrinen vedyntarve (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 56)

Klooratut liuottimet ja elektronien vastaanottajat	Kemiallisen pelkistymisen yhtälö	Stoikometrinen vedyn tarve (g/H₂(g))
PCE	$C_2Cl_4+4H_2 \rightarrow C_2H_4+4H^++4Cl^-$	20.57
TCE	$C_2HCl_3+3H_2 \rightarrow C_2H_4+3H^++3Cl^-$	21.73
cis-1,2-DCE	$C_2H_2Cl_2+2H_2 \rightarrow C_2H_4+2H^++2Cl^-$	24.05
Vinyylikloridi	$C_2H_3Cl+H_2 \rightarrow C_2H_4+H^++Cl^-$	31.00
Kloroformi	$CHCl_3+3H_2 \rightarrow CH_4 + 3H^++3Cl^-$	19.74
1,1,1-TCA	$C_2H_3Cl_3+3H_2 \rightarrow C_2H_6+3H^++3Cl^-$	22.06
1,1-DCA	$C_2H_4Cl_2+2H_2 \rightarrow C_2H_6+2H^++2Cl^-$	24.55
Kloorieteeni	$C_2H_5Cl+H_2 \rightarrow C_2H_6+H^++Cl^-$	32.18
Happi	$O_2+2H_2 \rightarrow 2H_2O$	7.94
Nitraatti	$2NO_3^-+2H^++5H_2 \rightarrow N_2+6H_2O$	12.30
sulfaatti	$2SO_4^{2-}+3H^++8H_2 \rightarrow H_2S+HS^-+8H_2O$	11.91
Rauta	$2Fe^{+3}+H_2 \rightarrow 2Fe^{+2}+2H^+$	55.41
Mangaani	$MnO_2+2H^++H_2 \rightarrow Mn^{+2}+2H_2O$	27.25
Hiilitetrakloridi	$CCl_4+4H_2 \rightarrow CH_4+4H^++4Cl^-$	19.08

Stoikometrinen vedyn tarve (taulukko 9), joka tarvitaan haitta-aineiden pelkistämiseksi, voidaan tämän jälkeen laskea määrittämällä H₂:n määrä, joka tarvitaan jokaisen elektronin vastaanottajan tai epäpuhtauden täydelliseen pelkistymiseen. Stoikometrinen vedyn tarve on pelkistettävän haitta-aineen ja vedyn moolimassasuhde (epäpuhtauden moolimassa/ H₂ moolimassa), joka perustuu tasapainotettuun kemialliseen pelkistysyhtälöön. Esimerkiksi TCE pelkistyy kokonaan eteeniksi seuraavan yhtälön mukaan (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 56.):



Koska 1:n TCE moolin (moolimassa = 131,4 g/mol) pelkistäminen eteeniksi vaatii 3 moolia vetyä (moolimassa = 2,0158 g/mol) stoikometrinen vedyn tarve on 131,4 g/mol jaettuna 6,047 g/mol tai 21,73 (g/H₂(g)).

$$\text{Vedyntarve(g/H}_2\text{(g))} = \frac{M(\text{TCE})}{M(\text{H}_2)}$$

Näin ollen 21.73 grammaa TCE:tä on hajonnut yhtä vety grammaa kohden. Samanlaiset laskelmat voidaan suorittaa kaikille klooratuille alifaattisille hiilivedyille ja elektronin vastaanottajille stoikometrisen vedyn tarpeen määrittämiseksi. (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 56.)

Taulukko 10. Eri ruokaöljyjen koostumus ja vapautuvien elektronien määrä anaerobisen fermentaation aikana (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 16)

	Atomia per substraatti mooli			H ₂ vapautuu per substraatti mooli	H ₂ moolia vapautuu substraatti grammaa kohden
	C	O	H		
Asetaatti	2,0	2,0	4,0	4,0	0,0666
Glukoosi	6,0	6,0	12,0	12,0	0,0666
Laktaatti	3,0	3,0	6,0	6,0	0,0666
Soija	56,3	6,0	99,5	156,5	0,1792
Puuvillansiemien	55,5	6,0	99,3	154,7	0,1792
Maissi	56,3	6,0	99,9	156,6	0,1793
Palmu	54,2	6,0	100,8	152,8	0,1800
Oliivi	56,2	6,0	102,7	157,8	0,1804
Voirasva	50,2	6,0	94,0	141,4	0,1782
Rypsi	57,1	6,0	102,3	159,3	0,1801
Maapähkinä	56,8	6,0	102,7	158,9	0,1803

Jokaisen klooratun alifaattisen hiilivedyn tai elektronin vastaanottajan massa on jaettava stoikometrisella vedyn tarpeella, jotta saadaan selville tarvittava vedyn määrä, joka tarvitaan epäpuhtauden vähentämiseksi (Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil 2006, 56).

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työt suoritettiin Doranova Oy:n tiloissa anaerobisissa olosuhteissa. Ensimmäisessä kokeessa käytössä oli 10 reaktiopulloa. Ennen substraattien lisäämistä reaktiopulloihin laitettiin hiekkaa ja aiemmin valmisteltua pohjavettä. Kahteen reaktiopulloon pipetoitiin yhtä kaupallista substraattia ja kaksi pulloa toimi nollanäytteenä. Kahteen pulloon pipetoitiin substraattia 1, kahteen pulloon substraattia 2 ja kahteen pulloon substraattia 3. Jotta jokaiseen pulloon saataisiin yhtä suuri määrä elektronin luovuttajia ja tulokset olisivat vertailtavia keskenään, jokaisen pullon COD-arvo laskettiin suunnilleen samaksi. Kun kaikki substraatit oli saatu reaktiopulloihin, voitiin pullot sulkea. Pulloja vielä käännettiin, ennen kuin ne laitettiin valolta suojaan.

Toisessa kokeessa pyrittiin korjaamaan ensimmäisessä kokeessa ilmenneitä virheitä ja otettiin vielä 2 muuta substraattia mukaan kokeisiin, substraatit 4 ja 5. Kokeet suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäiset kokeet, mutta substraattia 1,2,3,4, ja 5 sisältäneisiin pulloihin lisättiin vielä soodaa, koska ensimmäisen kokeen pH-arvot olivat välillä 4-5. Soodalla pyrittiin saamaan pH-arvo pysymään lähellä neutraalia.

Haitta-aineiden hajoamista seurattiin laboratorioskokeiden tulosten avulla. Reaktiopulloista otettiin näytteitä 4, 11, 20, 42, 65 ja 90 päivien kohdalla kokeiden aloittamisesta. Näytteet lähetettiin analysoitavaksi ALS Environmental laboratorioon. Näytteistä tutkittiin kloorattujen hiilivetyjen pitoisuuksia.

4 TULOKSET JA TARKASTELU

Jokaisen näytteenottopäivien tuloksista (taulukot 11-14) saatiin dataa, joka kertoi eri kloorattujen hiilivetyjen sen hetkisiä pitoisuuksia. Kun aikapisteissä

siirryttiin pidemmälle, saatiin eri substraattien deklloorinaatiokyky selville, kun verrattiin tuloksia aiemmista aikapisteistä saatuihin tuloksiin.

Taulukko 11. Ensimmäisen kokeen lähtötilanne

Lähtötilanne		kaupallinen substraatti 0pv	nollanäyte 0pv	substraatti 1 0pv	substraatti 2 0pv	substraatti 3 0pv
Päivämäärä		10.12.2020	10.12.2020	10.12.2020	10.12.2020	10.12.2020
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	112	112	112	112	112
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
tetrakloorieteeni	µg/L	687	687	687	687	687
trikloorieteeni	µg/L	107	107	107	107	107
vinyylkloridi	µg/L	307	307	307	307	307
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	115	115	115	115	115
klooratut hiilivedyt, 11 yhdiste	µg/L	909	909	909	909	909

Taulukko 12. Pitoisuuksien muutokset 4 päivää kokeen aloittamisesta

Näyte		kaupallinen substraatti 4pv	nollanäyte 4pv	substraatti 1 4pv	substraatti 2 4pv	substraatti 3 4pv
Päivämäärä		14.12.2020	14.12.2020	14.12.2020	14.12.2020	14.12.2020
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	106	86,2	81,9	97,2	77,8
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	3,27	3,53	2,73	3,04	2,25
tetrakloorieteeni	µg/L	916	585	770	855	939
trikloorieteeni	µg/L	71,6	55,6	55,6	62,5	65,4
vinyylkloridi	µg/L	215	174	166	193	169
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	109	89,7	84,6	100	80
klooratut hiilivedyt, 11 yhdiste	µg/L	1100	730	910	1020	1080

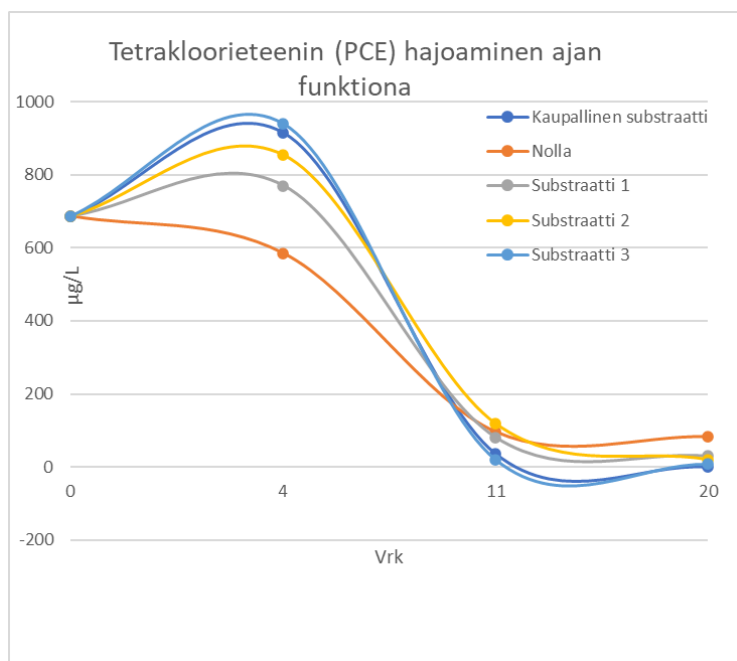
Taulukko 13. Pitoisuuksien muutokset 11 päivää kokeen aloittamisesta

Näyte		kaupallinen substraatti 11pv	nollanäyte 11pv	substraatti 1 11pv	substraatti 2 11pv	substraatti 3 11pv
Päivämäärä		21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	172	42,1	124	98,5	164
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	1,99	0,6	1,16	1,3	1,61
tetrakloorieteeni	µg/L	36,8	95,9	81,1	119	19,9
trikloorieteeni	µg/L	34,7	21,5	37,9	58,3	14,9
vinyylkloridi	µg/L	106	89,9	97,7	106	74,6
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	174	42,7	125	99,8	166
klooratut hiilivedyt, 11 yhdiste	µg/L	245	160	244	277	200

Taulukko 14. Pitoisuuksien muutokset 20 päivää kokeen aloittamisesta

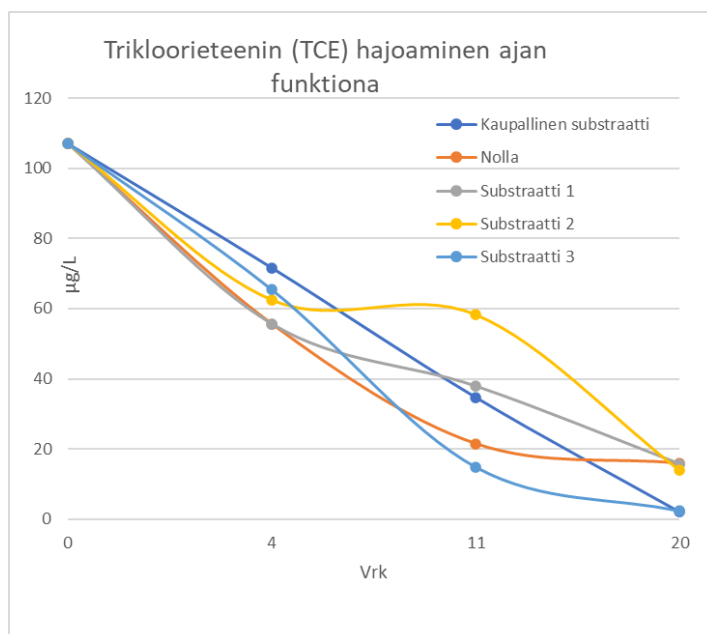
Näyte		kaupallinen substraatti 20pv	nollanäyte 20pv	substraatti 1 20pv	substraatti 2 20pv	substraatti 3 20pv
Päivämäärä		21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020	21.12.2020
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	229	28,2	182	159	247
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	1,64	0,4	1,31	1,5	1,79
tetrakloorieteeni	µg/L	1,16	82,9	29,8	21,1	8,37
trikloorieteeni	µg/L	2,03	15,9	15,7	13,9	2,41
vinyylkloridi	µg/L	86,5	71,8	86,1	83,3	98,3
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	231	28,6	183	160	249
klooratut hiilivedyt, 11 yhdiste	µg/L	234	127	229	196	260

Aikapisteiden tuloksista tehtiin myös havainnollistavat kuvaajat. Ensimmäisen kokeen tuloksia (liite 4) tarkasteltaessa voidaan huomata, että 4 neljännen päivän kohdalla tetrakloorieteenien tulokset (kuva 11) ovat nousseet kaikkien paitsi nolla näytteen kohdalla, jonka pitoisuus on laskenut. 4–11 päivien välillä on tapahtunut kaikissa reaktiopulloissa pitoisuuksien voimakasta laskua, jonka jälkeen pitoisuudet ovat tasaantuneet.



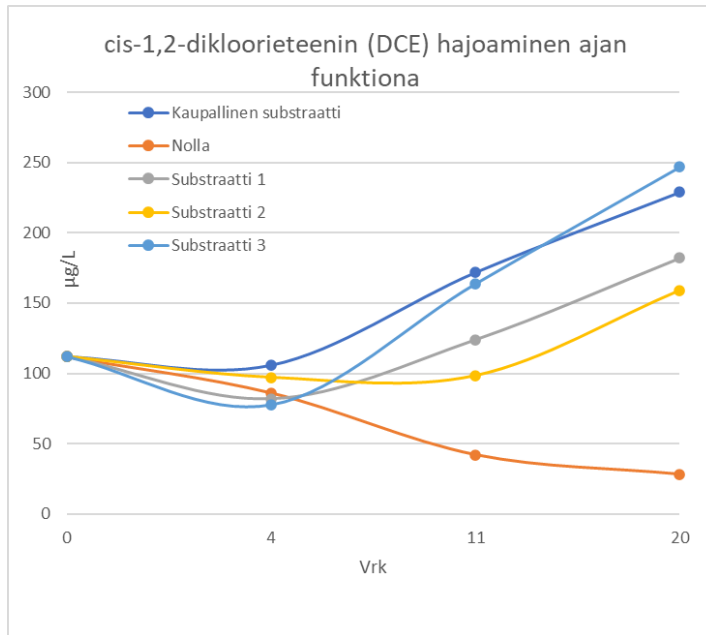
Kuva 9. Tetrakloorieteenien hajoaminen ajan funktiona

Trikloorieteenin pitoisuudet ovat laskeneet jokaisessa reaktiopullossa (kuva 12). Substraatti 2 kohdalla päivien 4–11 aikana pitoisuuden lasku on ollut vähäistä verrattuna muihin substraatteihin.



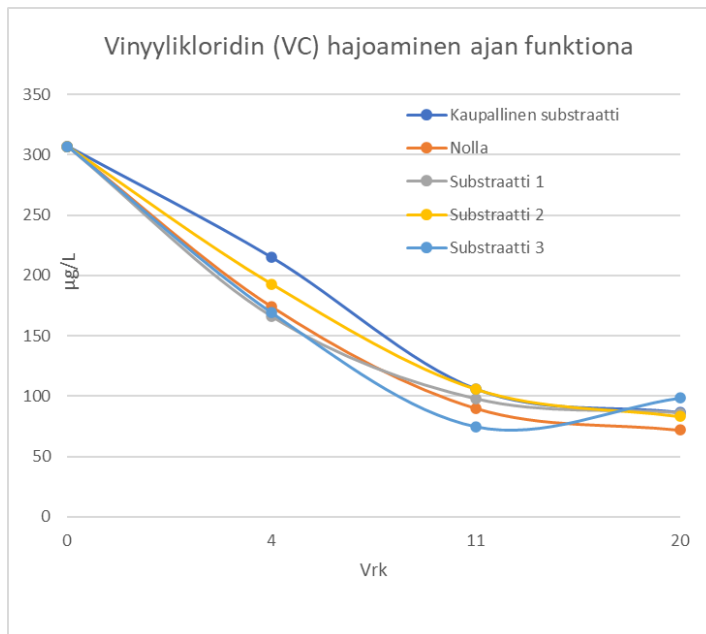
Kuva 10. Triklloorieteenien hajoaminen ajan funktiona.

Cis-1,2-dikloorieteenien kohdalla pitoisuudet ovat lähtötilanteesta laskeneet ensimmäiseen aikapisteeseen (kuva 13), mutta tämän jälkeen pitoisuudet ovat alkaneet nousta kaikissa paitsi nollanäytteessä, jossa pitoisuudet ovat pienentyneet tasaisesti.



Kuva 11. *cis*-1,2-dikloorieteenien hajoaminen ajan funktiona.

Vinyylidikloridin kohdalla kaikissa reaktiopulloissa on tapahtunut pitoisuuksien laskua päivään 11 asti (kuva 14), jonka jälkeen pitoisuudet ovat alkaneet taasaantua. Substraatti 3 kohdalla laskua on tapahtunut myös päivään 11 asti, mutta tämän jälkeen on ollut havaittavissa pientä pitoisuuden nousua.



Kuva 12. Vinyylidikloridin hajoaminen ajan funktiona.

Ensimmäiset kokeet päätettiin lopettaa 21.12.2020, johtuen nollanäytteen pitoisuuksien muutoksista.

Kokeeseen 2 (liite 4) otettiin mukaan vielä 2 uutta substraattivaihtoehtoa. Reaktio pulloihin lisättiin vielä soodaa pH puskuriksi, koska epäilimme ensimmäisessä kokeessa ilmenneen alhaisen pH:n aiheuttaneen ongelmia. Tuloksia vertailtiin keskenään samalla tavalla kuin ensimmäisen kokeen tuloksia (taulukot 15-18).

Taulukko 15. Toisen kokeen lähtötilanne

Lähtötilanne		kaupallinen substraatti 0pv	nollanäyte 0pv	substraatti 1 0pv	substraatti 2 0pv	substraatti 3 0pv	substraatti 4 0pv	substraatti 5 0pv
Päivämäärä		4.1.2021	4.1.2021	4.1.2021	4.1.2021	4.1.2021	4.1.2021	4.1.2021
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	3800	3800	3800	3800	3800	3800	3800
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89
tetrakloorieteeni	µg/L	315	315	315	315	315	315	315
trikloorieteeni	µg/L	287	287	287	287	287	287	287
vinyylikloridi	µg/L	520	520	520	520	520	520	520
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	3810	3810	3810	3810	3810	3810	3810
klooratut hiilivedyt, 11 yhdistettä	µg/L	4410	4410	4410	4410	4410	4410	4410

Taulukko 16. Pitoisuuksien muutokset 4 päivää kokeen aloittamisesta

Näyte		kaupallinen substraatti 4pv	nollanäyte 4pv	substraatti 1 4pv	substraatti 2 4pv	substraatti 3 4pv	substraatti 4 4pv	substraatti 5 4pv
Päivämäärä		3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	2800	2390	2350	2210	2290	2080	2290
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	6,89	7,22	4,92	7,12	6,65	6,36	6,61
tetrakloorieteeni	µg/L	98,5	85,5	84,3	123	104	98,9	94,7
trikloorieteeni	µg/L	136	114	112	132	123	116	121
vinyylikloridi	µg/L	468	414	403	411	422	400	416
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	2810	2400	2350	2220	2300	2090	2300
klooratut hiilivedyt, 11 yhdistettä	µg/L	3040	2600	2550	2470	2520	2300	2510

Taulukko 17. Pitoisuuksien muutokset 11 päivää kokeen aloittamisesta

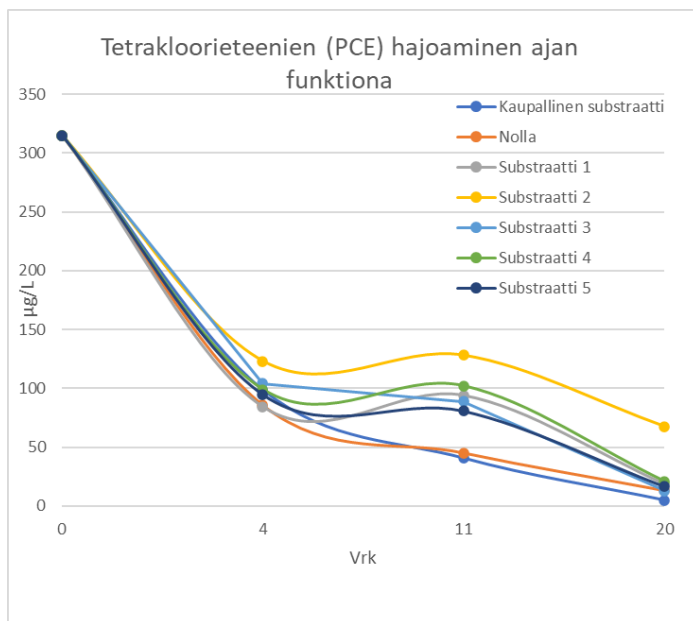
Näyte		kaupallinen substraatti 11pv	nollanäyte 11pv	substraatti 1 11pv	substraatti 2 11pv	substraatti 3 11pv	substraatti 4 11pv	substraatti 5 11pv
Päivämäärä		3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	1150	1560	1190	1940	1560	1260	1410
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	3,71	4,48	4,81	6,6	4,87	5,22	4,66
tetrakloorieteeni	µg/L	40,7	45,1	94,1	128	88,9	102	80,8
trikloorieteeni	µg/L	56,9	80,9	97,8	146	98,6	107	97,5
vinyylikloridi	µg/L	218	210	288	298	260	307	271
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	1150	1560	1190	1950	1560	1260	1410
klooratut hiilivedyt, 11 yhdistettä	µg/L	1250	1690	1390	2220	1750	1470	1590

Taulukko 18. Pitoisuuksien muutokset 20 päivää kokeen aloittamisesta

Näyte		kaupallinen substraatti 20pv	nollanäyte 20pv	substraatti 1 20pv	substraatti 2 20pv	substraatti 3 20pv	substraatti 4 20pv	substraatti 5 20pv
Päivämäärä		3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021	3.2.2021
cis-1,2-dikloorieteeni	µg/L	1050	1180	1260	1670	1420	1240	1340
trans-1,2-dikloorieteeni	µg/L	1,97	1,23	2,06	3,12	2,38	2	2,16
tetrakloorieteeni	µg/L	5,02	13,2	18,8	67,4	13	20,8	16,7
trikloorieteeni	µg/L	4,7	24,3	30,5	75,8	21,6	34,2	27,6
vinyylikloridi	µg/L	196	54,2	190	226	201	196	184
1,2-dikloorieteenit, summa	µg/L	1050	1180	1260	1670	1420	1240	1340
klooratut hiilivedyt, 11 yhdistettä	µg/L	1060	1220	1310	1820	1460	1300	1390

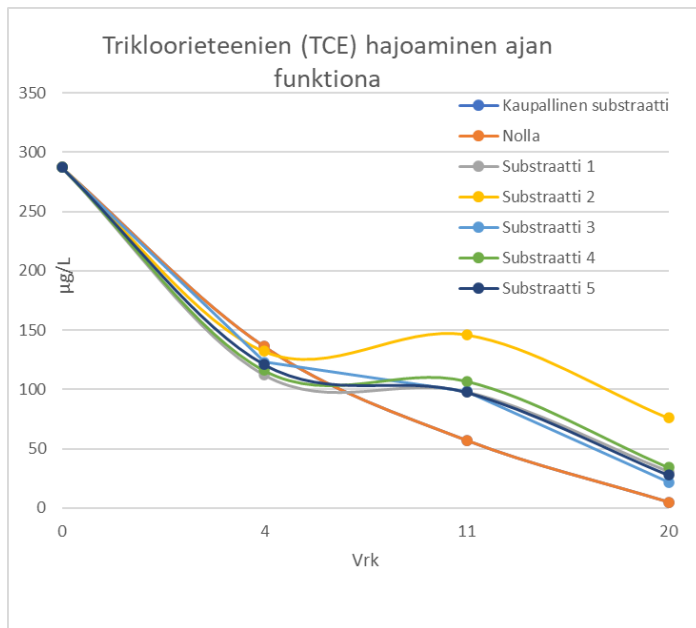
Kuvaajasta (kuva 15) voidaan nähdä, että tetrakloorieteenin kohdalla nopein lasku tapahtui neljän ensimmäisen päivän aikana, jolloin lasku oli nopeinta.

4–11 päivien kohdalla pitoisuuksiin ei ole tullut juurikaan muutosta. Poikkeuksia olivat nollanäyte ja kaupallinen substraatti, joilla lasku oli huomattavasti suurempaa.



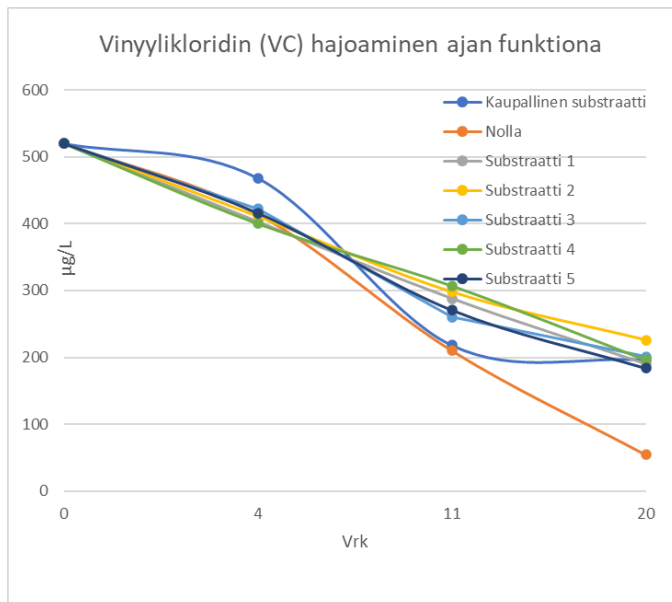
Kuva 13. Tetrakloorieteenien hajoaminen ajan funktiona.

Trikloorieteenin kohdalla suurin lasku pitoisuuksissa tapahtui myös neljän ensimmäisen päivän aikana, jonka jälkeen 4–11 päivien välillä ei juurikaan muutoksia pitoisuuksiin tullut (kuva 16). Lukuun ottamatta nollanäytettä, jonka pitoisuus laski tasaisesti.



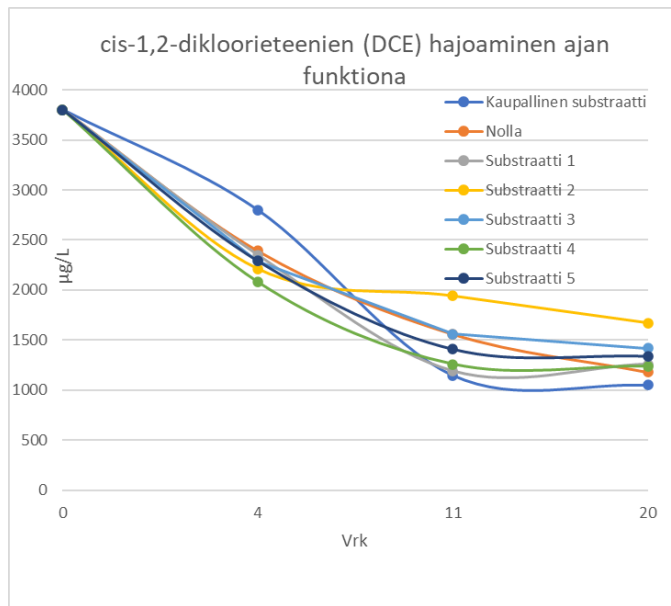
Kuva 14. Trikloorieteenien hajoaminen ajan funktiona.

Vinyylikloridin pitoisuudet laskivat tasaisesti, jokaisessa reaktiopullossa päivästä 0 (lähtötilanne) päivään 20 (kuva 17).



Kuva 15. Vinyylikloridin hajoaminen ajan funktiona.

Lähtötilanteessa *cis*-1,2-kloorieteeneitä oli reaktiopulloissa eniten. Kuvaajasta voidaan nähdä niiden voimakas lasku jokaisessa reaktiopullossa 11 päivään asti (kuva 18), jonka jälkeen pitoisuudet ovat alkaneet tasaantua



Kuva 16. cis-1,2-dikloorietaanien hajoaminen ajan funktiona.

Kokeet päätettiin lopettaa 20 päivän kohdalla, johtuen nollanäytteen muutoksien ollessa yhtä suuria kuin muissa reaktiopulloissa.

Kokeessa 1 tertakloorietaanin, trikloorietaanin ja vinyylikloridin käyrät olivat samanlaisia kuin nollanäytteet käyrät. Dikloorietaanien kohdalla nollanäytteen pitoisuudet jatkoivat laskua, mutta muissa pulloissa pitoisuudet kasvoivat. Kokeessa 2 kaikkien reaktiopullojen pitoisuudet laskivat tasaisesti. Tämä voi tarkoittaa sitä, että pulloissa ei juurikaan tapahdu biologista pelkistymistä, tai se on vaikeata todeta, koska nollanäytteen pitoisuudet ovat muuttuneet. Reaktiopullojen pitoisuuksien lasku on myös todella nopeaa.

Kun tetrakloorietaanin pitoisuudet alkavat reaktiopulloissa pienentyä, pitäisi trikloorietaanien pitoisuuksien reaktiopulloissa lähteä nousemaan. Kun trikloorietaanien pitoisuudet saavuttavat huipun ja pitoisuudet alkavat pienentymään pitäisi dikloorietaanien pitoisuuksien lähteä nousemaan. Vinyylikloridin pitoisuuksien pitäisi alkaa nousemaan, kun dikloorietaanien pitoisuudet saavuttavat huipun ja lähtevät laskemaan. (Enhanced Anaerobic Bioremediation s.a.)

Molemmassa kokeissa kloorietaanien pitoisuudet saatiin pienemmään reaktiopulloissa jo 20 ensimmäisen päivän aikana. Jo ensimmäisen 4 päivän aikana pitoisuudet olivat pienentyneet kaikissa reaktiopulloissa. Kuten kuvajista voi nähdä, kaikkien käytössä olleiden substraatti käyrät olivat kuitenkin

hyvin samankaltaiset kuin kaupallisen substraatin. Pitoisuuksien väheneminen kaikissa reaktiopullossa vaikuttaa kuitenkin olevan, ehkä jopa liian nopeaa. Yleensä kunnostus urakat kestävät useita kuukausia, jonka jälkeen pitoisuudet saadaan vasta tavoitteisiin. Jos reaktiopullojen pitoisuuksien lasku jatkuisi yhtä nopeana ja kokeita oltaisiin vielä jatkettu, voisi pitoisuudet saada lähelle 0 jo seuraavan kuukauden aikana.

Molemmat kokeet jouduttiin keskeyttämään 20 päivää kokeen aloittamisesta johtuen nolla näytteen muutoksista. Nolla näytteissä ei pitäisi esiintyä mitään muutoksia koko kokeen aikana. Onko ollut mahdollista, että pohjavesi on sisältänyt jo valmiiksi elektronin luovuttajia, jolloin deklorinaation on jatkunut nollanäytteessä. Reaktiopulloihin ei saatu käyttöön PIMA maata, mikä tarkoitti sitä, että reaktiopulloihin laitettava hiekka tuli käsitellä itse. Voi olla mahdollista, että itse käsitelty hiekka on adsorboinut pohjavedessä olleita kloorieteenit, jolloin se näkyisi myös nollanäytteessä pitoisuuksien laskuna.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tarkoituksen oli kehittää Doranova Oy:lle oma ARD-substraatti. Tulosten perusteella ei voida osoittaa, että jotkut substraatit olisivat olleet tehokkaampia kuin käytössä ollut kaupallinen substraatti.

Valittujen substraattien kustannukset ovat huomattavasti pienempiä kuin kaupallisen substraatin, koska ne on valittu teollisuuden jätteistä ja sivuvirroista. Kaikki substraatit ovat maaperässä helposti mikrobien saatavilla ja niillä on mahdollista jakautua maaperässä tasaisesti. B12-vitamiinin kohdalla tultiin siihen tulokseen, että sen hankkiminen kokeita varten on paljon helpompaa kuin yrittää tuottaa sitä itse anaerobisissa olosuhteissa mikrobien avulla. Tämä johtuu siitä, että B12-vitamiinin anaerobinen tuottaminen tarvitsee DMBI:a, jonka muodostumiseen tarvitaan happea. Tämä taas tarkoittaa sitä, että DMBI pitäisi tuottaa erikseen aerobisissa olosuhteissa ja lisätä vasta sitten substraattiin. B12-vitamiini on kallista, joten jos substraatin hintaa halutaan vielä alaspäin,

tulisi B12-vitamiinin tuottamiseen maaperässä keksiä joku ratkaisu. DMBI:n kohdalla pitäisi selvittää kuinka isoista kustannuksista olisi kyse, jos sitä tuotaisi itse.

Yritys sai opinnäytetyön kautta oman substraatin kehittämisen alulle. Mikäli testatuilla substraateilla saadaan jatkossa kaupallista substraattia vastaavia tuloksia, on siitä yritykselle taloudellista hyötyä. PIMA kohteiden kilpailutuksessa on mahdollista saada enemmän työmaita yritykselle, koska substraatin kustannukset ovat huomattavasti pienemmät. Substraattien kaupallistaminenkin on jatkossa mahdollista, jos on kysyntää.

LÄHTEET

Adams, G. Fufeyin, P. Okoro, S & Ehinomen, I. 2015. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. PDF-dokumentti. Saatavissa: http://soil-health.ucdavis.edu/application/files/1215/4208/1811/Bioremediation_Biostimulation_and_Bioaugmentation_A_Review.pdf [viitattu 7.4.2021].

Battersby, A. 1993. Biosynthesis of Vitamin B12. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ar00025a003> [viitattu 8.4.2021].

Berg, J. 2016. ETL:n jäte- ja sivuvirtaselvitys 2016. PDF-dokumentti. Saatavissa: http://www.etl.fi/media/aineistot/raportit-ja-katsaukset/etl-jate_ja_sivuvirtaselvitys_2016.pdf [viitattu 8.4.2021].

Bioremediation. 2021. United States Environmental Protection Agency. WWW-dokumentti. Päivitetty 19.3.2021. Saatavissa: [https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Anaerobic_Bioremediation_\(Direct\)](https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Anaerobic_Bioremediation_(Direct))[viitattu 7.4.2021].

Bhandari, A. Surampalli, R. Champagne, P. Ong, S. Tyagi, R & Lo, I. 2007. Remediation Technologies for Soils and Groundwater. E-kirja. American Society of Civil Engineers. Saatavissa: <https://kaakkuri.finna.fi/> [viitattu 7.4.2021].

Brennan, R. Sanford, A & Werth, C. 2006. Chitin and corncobs as electron donor sources for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.xamk.fi/science/article/pii/S0043135406002181> [viitattu 8.4.2021].

Caspi, R. 2007. Pathway: 5,6-dimethylbenzimidazole biosynthesis I (aerobic). WWW-dokumentti. Päivitetty 26.11.2013. Saatavissa: <https://bio-cyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5523> [viitattu 8.4.2021].

Chamlagain, B. 2016. Fermentation fortification of active vitamin B12 in food matrices using Propionibacterium freudenreichii: Analysis, production and stability. Helsingin yliopisto. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. Väitöskirja. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/168927/Fermenta.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [viitattu 8.4.2021].

Delgado, A. Parameswaran, P. Fajardo-Williams, D. Halden, R & Krajmalnik-Brown, R. 2012. Role of bicarbonate as a pH buffer and electron sink in microbial dechlorination of chloroethenes. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-11-128> [viitattu 8.4.2021].

De Miranda, P. 2019. Science and engineering of hydrogen-based energy technologies. E-kirja. Lontoo: Elsevier. Saatavissa: <https://kaakkuri.finna.fi/> [viitattu 8.4.2021].

DSS. 2003. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://docplayer.fi/2111801-Tietotaito-kalvot-tuotantolaitokset-projektit.html> [viitattu 8.4.2021].

Enhanced Anaerobic Bioremediation. s.a. Regenesi. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://regenesi.com/en/site-remediation-solutions/enhanced-anaerobic-bioremediation/> [viitattu 12.5.2021].

Fang, H. Kang, J & Zhang, D. 2017. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://microbial-cellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0631-y> [viitattu 8.4.2021].

Fermentation. s.a. Houghton Mifflin Harcourt Publishing Company. PDF-dokumentti. Saatavissa: http://whsa-bechtol.weebly.com/uploads/1/3/1/5/13157999/ir_4.6.pdf [viitattu 8.4.2021].

Futagami, T. Goto, M & Furukawa, K. 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/tcr.20134> [viitattu 7.4.2021].

Goswami, M. Chakraborty, P. Mukherjee, K. Mitra, G. Bhattacharyya, P. Dey, S & Tribedi, P. 2018. Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://medcraveonline.com/JMEN/bioaugmentation-and-biostimulation-a-potential-strategy-for-environmental-remediation.html> [viitattu 24.3.2021].

He, J. Holmes, V. Lee, P & Alvarez-Cohen, L. 2007. Influence of Vitamin B12 and Cocultures on the Growth of Dehalococcoides Isolates in Defined Medium. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://aem.asm.org/content/aem/73/9/2847.full.pdf> [viitattu 8.4.2021].

He, Y & Su, Y. 2015. Use of Additives in Bioremediation of Contaminated Groundwater and Soil. PDF-dokumentti. Saatavissa: https://pdfs.semanticscholar.org/579d/d915f071a539eef6342e0dcef2ba97789f4f.pdf?_ga=2.217353494.1240571085.1596380599-631200539.1589550405 [viitattu 8.4.2021].

Hernandez-Maldonado, A & Blaney, L. 2020. Contaminants of emerging concern in water and wastewater. E-kirja. Iso-Britannia: Elsevier. Saatavissa: <https://kaakkuri.finna.fi/> [viitattu 8.4.2021].

Kalvosuodatus s.a. Opetushallitus. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://www.oph.fi/sites/default/files/documents/kalvosuodatus.pdf> [viitattu 8.4.2021].

Kang, Z. Zhang, J. Zhou, J. Qi, Q. Du, G & Chen, J. 2012. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.xamk.fi/science/article/pii/S0734975012000791> [viitattu 8.4.2021].

Khan Academy. Fermentation and anaerobic respiration. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/cellular-respiration-ap/a/fermentation-and-anaerobic-respiration> [viitattu 8.4.2021].

Long, C & Borden, R. 2006. Enhanced reductive dechlorination in columns treated with edible oil emulsion. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.xamk.fi/science/article/pii/S0169772206000878> [viitattu 7.4.2021].

Miura, T. Yamazoe, A. Ito, M. Ohji, S. Hosoyama, A. Takahata, Y & Fujita, N. 2015. The Impact of Injections of Different Nutrients on the Bacterial Community and Its Dechlorination Activity in Chloroethene-Contaminated Groundwater. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462927/> [viitattu 24.3.2021].

Moo-Young, M. Agathos, S. Butlet, M. Cui, Z. Grodzinski, B. Moreira, A. Stenuit, B. Webb, C & Ye, H. 2019. Comprehensive Biotechnology. E-kirja. Elsevier. Saatavissa <https://kaakkuri.finna.fi/> [viitattu 7.4.2021].

Protocol for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents Using Edible Oil. 2007. Solution-IES. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://clu-in.org/download/remed/Final-Edible-Oil-Protocol-October-2007.pdf> [viitattu 8.4.2021].

Protocol for Enhanced In-Situ Bioremediation Using Emulsified Edible Oil. 2006. Solutions-IES. PDF-dokumentti. Saatavissa: https://clu-in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Treatment_Technologies/Edible-Oil-Protocol.pdf [viitattu 7.4.2021].

Sabaratnam, V & Hassan, M. s.a. Biohydrogen production via Fermentation of biowastes by microorganisms. State of the art and progress in production of biohydrogen. E-kirja. Bentham science Publisher. Saatavissa: <https://kaakkuri.finna.fi/> [viitattu 9.4.2021].

The Interstate Technology & Regulatory Council. 2008. In Situ Bioremediation of Chlorinated Ethene: DNAPL Source Zones. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=12> [viitattu 7.4.2021].

Thomas, Y & Su, C. 2015. Use of Additives in Bioremediation of Contaminated Groundwater and Soil. WWW-dokumentti. Saatavissa: https://pdfs.semanticscholar.org/579d/d915f071a539eef6342e0dcef2ba97789f4f.pdf?_ga=2.217353494.1240571085.1596380599-631200539.1589550405 [viitattu 7.4.2021].

Tossavainen, O & Sahlstein, J. 2005. Menetelmä käytettäväksi vähälaktoosisen tai laktoosittoman maitotuotteen valmistamiseksi. FI 115752B. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c0/8c/bf/cf57593d1c8dda/FI115752B.pdf> [viitattu 8.4.2021].

Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents. 2004. The Parson Corporation. PDF-dokumentti. Saatavissa: <http://www.eosremediation.com/download/Anaerobic%20Bioremediation/Additional%20Anaerobic%20Bioremediation%20Documents/Principles%20and%20Practices.pdf> [viitattu 24.3.2021].

Pääkkönen, J. Vuorikoski, S. Pirkanniemi, K & Hyytiä, H. 2004. Paras käytettävissä oleva tekniikka (BAT) Suomen perunatärkkelysteollisuudessa. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://core.ac.uk/download/pdf/16390244.pdf> [viitattu 8.4.2021].

Rogers, K. s.a. Britannica. Bacterial metabolism. WWW-dokumentti. Saatavissa: <https://www.britannica.com/science/bacteria/Bacterial-metabolism> [viitattu 8.4.2021].

Technical Protocol for Using Soluble Carbohydrates to Enhance Reductive Dechlorination of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons. 2002. ARCADIS G&M. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://clu-in.org/download/contaminantfocus/tce/BioTechProtocol.pdf> [viitattu 7.4.2021].

OVA-ohjeet. 2019. Työterveyslaitos. WWW-dokumentti. Päivitetty 20.9.2019. Saatavissa: <https://www.ttl.fi/ova/> [viitattu:24.3.2021].

Van Haandel, A & Van der Lubbe, J. 2019. Anaerobic sewage treatment. E-kirja. Lontoo :IWA Publishing. Saatavissa: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/xamk-ebooks/reader.action?docID=5892155&query=Anaerobic+sewage+treatment.+> [viitattu 8.4.2021].

Ylönen, K. 2005. Eräät orgaaniset ja epäorgaaniset haitta-aineet Etelä-Savon tärkeimpien vedenottamoiden raaka- ja pohjavesissä. PDF-dokumentti. Saatavissa: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/134557/ESAmo65.pdf?sequence=23> [viitattu 7.4.2021].