

T. Petteri Marjanen

MIKROBEJA SISÄLTÄVÄT PUHDISTUS- AINEET RASVAN JA ÖLJYN POISTAMI- SESSA KOVILTA PINNOILTA

Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta (ENS)
Kandidaatintyö
Syyskuu 2019

TIIVISTELMÄ

T. Petteri Marjanen:

Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet rasvan ja öljyn poistamisessa kovilta pinnoilta
(Microbial-based cleaning products for removing fats, oils and greases from hard surfaces)

Kandidaatintyö

Tampereen yliopisto

Ympäristö- ja energiatekniikan tutkinto-ohjelma

Syyskuu 2019

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käyttö on viime vuosina lisääntynyt erityisesti ammattimaisessa siivouksessa. Niitä markkinoidaan ympäristöystävällisempänä vaihtoehtona perinteisille kemikaaleille. Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat vakiinnuttaneet asemansa hajujen poistajina ja orgaanisen aineen syöjinä putkista. Joitakin mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita suositellaan käytettäväksi ravintolan lattian puhdistamiseen. Ravintoloissa haasteena on lattioiden vaikeasti puhdistettava rasvainen lika.

Kandidaatintyössä selvitettiin mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden etuja ja haittoja perinteisiin puhdistusaineisiin verrattuna. Tietoa haettiin puhdistusaineiden toimintamekanismeista, puhdistustehosta, aineissa käytetyistä mikrobeista, mikrobikonsentraatioista, mikrobien ominaisuuksista ja mahdollisista turvallisuusriskeistä.

Teoriassa mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden avulla voidaan pienentää ympäristöön joutuvien kemikaalien määrää, saada perinteisiä kemikaaleja pitempi vaikutusaika ja haitattomamat lopputuotteet: vesi ja hiilidioksidi. Tutkimuksia mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden toimivuudesta käytännön tilanteissa on saatavilla varsin niukasti. Kirjallisuusselvityksen perusteella havaittiin, että mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden toimintamekanismeja ja puhdistustehoa ei ole tieteellisesti todistettu.

Kirjallisuusselvityksen perusteella selvästi yleisin mikrobisuku, jonka jäseniä lisätään puhdistusaineisiin, on *Bacillus*. Seuraavaksi yleisimpiä puhdistusaineissa käytettyjä mikrobisukuja ovat *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Rhodopseudomonas* ja *Saccharomyces*. Osa käytetyistä mikrobeista ei teoriassa vaikuta sopivalta kovien pintojen puhdistukseen. Käyttöliuoksen mikrobikonsentraation raja-arvoiksi saatiin kirjallisuuden perusteella 1×10^5 – 5×10^9 pmy/ml.

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käyttö ei näytä lisäävän ilmassa olevien mikrobien määrää huolestuttavalla tavalla. Puhdistusaineisiin lisätyt bakteerit eivät näytä yksinään aiheuttavan allergiaa. Tutkimustietoa mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden terveys- ja ympäristövaiikutuksista kaivataan lisää. Tuotteiden laadunvalvonta on olennaista, jos tuotteita halutaan käyttää ravintolan lattian puhdistukseen, koska ruokaan ei saa päätyä taudinaiheuttajia.

Avainsanat: mikrobeja sisältävät puhdistusaineet, rasva, öljy, kovien pintojen puhdistus.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Kandidaatintyöni aihe päätettiin yhdessä Kiilto Oy:n Heidi Kähkösen kanssa. Ohjausta antoivat sekä Johanna Rinta-Kanto että Riikka Lahtinen. Ilman Riikka Lahtisen apua yliopiston henkilökohtaisena opettajamentorinani tämä työ olisi jäänyt tekemättä, koska en olisi osannut ottaa yhteyttä Heidi Kähköseen. Ilman Johanna Rinta-Kannon innostusta mikrobiologiaa kohtaan moni kysymykseni olisi jäänyt vaille vastausta. Tämän kolmikon avulla pääsin tekemään juuri sellaisen kandidaatintyön mitä toivoin.

Tampereella, 11.9.2019

T. Petteri Marjanen

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. RASVAA JA ÖLJYÄ KOVILTA PINNOILTA POISTAVAT PUHDISTUSAINEEET	3
2.1 Likatyypit, puhdistusolosuhteet ja puhdistusmenetelmät	3
2.2 Perinteiset puhdistusaineet	4
2.3 Entsyymejä sisältävät puhdistusaineet	5
2.4 Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet	7
2.4.1 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen mekanismi	8
2.4.2 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen tehon testaaminen	8
2.4.3 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen konsentraatio	9
3. MIKROBEJA SISÄLTÄVIEN PUHDISTUSAINEIDEN AINESOSIA	11
3.1 Puhdistusaineissa käytettyjä mikrobeja	11
3.2 Puhdistusaineissa käytettyjen mikrobien ominaisuuksia	13
3.3 Muita ainesosia mikrobien lisäksi	14
4. TURVALLISUUS, YMPÄRISTÖ JA LAATU	16
4.1 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen terveysvaikutukset	16
4.2 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen ympäristövaikutukset	18
4.3 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen laadunvalvonta	19
5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	21
6. JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET	23
LÄHTEET	24

LYHENTEET JA MERKINNÄT

ATCC	American Type Culture Collection
CBS-KNAW	Centraalbureau voor Schimmelcultures – Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EFSA	European Food Safety Authority
IRSST	Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail
NVWA	Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority
QPS	Qualified presumption of safety
sp.	Lyhennettä sp. käytetään silloin, kun oikea lajinimi ei ole tiedossa eli se tarkoittaa mikrobisuvun jotakin lajia.
spp.	monikko lyhenteelle sp. eli mikrobisuvun jotkin lajit
subsp.	lyhenne sanasta subspecies eli alalaji
VKM	Norjan tieteellinen komitea elintarvikkeille ja ympäristölle (Norwegian Scientific Committee for Food and Environment)
pmy	pesäkettä muodostavaa yksikköä

1. JOHDANTO

Paljon rasvaa ja öljyä käyttävässä keittiössä lattialle päätyy rasvaista likaa. Lattian rasvaista likaa ei pystytä tiellä olevien kalusteiden takia puhdistamaan koneellisesti, ja käsimenetelmin rasvaisen lian poistaminen on vaikeaa. Perinteisten kemikaalien kontaktiaika lian kanssa on lyhyt.

Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet perustuvat elävien mikro-organismien kykyyn hyödyntää likaa aineenvaihdunnassaan. Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden kontaktiaika lian kanssa on pitkä, sillä käyttöliuos levitetään pinnoille ja jätetään huuhtelematta [1]. Valmistajat kertovat, että mikrobit säilyvät elinvoimaisina ja kuluttavat likaa ravintona niin kauan kuin sitä on jäljellä. Kun ravinto loppuu, mikrobit joko kuolevat tai vetäytyvät toimimattomaan itiömuotoon. Itiöt voivat aktivoitua olosuhteiden muuttuessa taas suotuisiksi.

Viime vuosina mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita on alkanut näkyä enemmän Euroopankin markkinoilla [2]. Tämä johtuu, ainakin osittain, lisääntyneestä tietoisuudesta kemikaalien ympäristö- ja terveysvaikutuksista. Mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita markkinoidaan ympäristöystävällisempänä vaihtoehtona perinteisille kemikaaleille. Ne sisältävät vähemmän haitallisia aineita ja mikrobien aineenvaihdunnan kautta rasvainen lika voi lopulta muuttua vedeksi ja hiilidioksidiksi [3].

Kandidaatintyössä haetaan kirjallisuusselvityksen avulla vastausta seuraaviin kysymyksiin: Mitä etuja ja haittoja mikrobeja sisältävillä puhdistusaineilla on perinteisiin puhdistusaineisiin verrattuna? Kuinka tehokkaita mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat rasvan ja öljyn poistamisessa kovilta pinnoilta? Mitä mikrobeja ja muita ainesosia markkinoilla olevat tuotteet sisältävät? Minkälaisia riskejä terveydelle ja ympäristölle tuotteiden käytöstä mahdollisesti aiheutuu?

Kandidaatintyö koskee enimmäkseen rasvan ja öljyn poistamista kovilta pinnoilta. Mikrobien käyttö hajujen poistossa, viemärien puhdistuksessa ja saniteettitilojen puhdistuksessa on jo vakiintunutta, joten niitä ei käsitellä tässä työssä. Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä sairaalaympäristössä on julkaistu vuosina 2014–2019 lukuisia artikkeleita [4–13]. Tässä kandidaatintyössä sairaalaympäristöön liittyvää puhdistusta ei käsitellä tarkemmin. Myös hiilivedyistä koostuvien teollisuudessa käytettävien öljyjen poistamiseen on olemassa mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita. Ne voivat sisältää samoja bakteereja kuin kasvi- ja eläinperäisten rasvojen poistamiseen tarkoitetut aineet. Tässä työssä on kuvattu vain kasvi- ja eläinperäisiin rasvoihin liittyviä mekanismeja. Teollisuudessa käytettävien hiilivetypohjaisten öljyjen puhdistamisesta kiinnostunut voi hakea tietoa bioremediaatiosta.

Kandidaatintyön alussa kuvaillaan lyhyesti ravintolan lattian puhdistusprosessiin liittyvää likaa ja olosuhteita. Sen jälkeen kerrotaan rasvan ja öljyn puhdistamiseen liittyvistä kemiallisista, entsyy-

mejä sisältävistä ja mikrobeja sisältävistä puhdistusaineista, tässä järjestyksessä. Sitten kerrotaan mitä mikrobeja puhdistustuotteissa on käytetty, ja kerrotaan tarkemmin joidenkin puhdistusaineissa käytettyjen mikrobien ominaisuuksista. Mikrobien lisäksi puhdistusaineet sisältävät yleensä muitakin ainesosia, joista kerrotaan ennen terveys- ja ympäristövaikutusten arvioimista. Tämän jälkeen suositellaan vielä laadunvalvontaan liittyviä käytännön toimia. Työn lopuksi esitetään yhteenveto ja johtopäätökset sekä ehdotuksia jatkotutkimuksiin.

2. RASVAA JA ÖLJYÄ KOVILTA PINNOILTA POISTAVAT PUHDISTUSAINEEET

2.1 Likatyypit, puhdistusolosuhteet ja puhdistusmenetelmät

Rasvaa ja öljyä käyttävän keittiön lattialle voi joutua roiskeita paistoöljyistä ja eläinrasvoista. Lattian rasvainen lika voi olla nestemäisessä (öljy) tai kiinteässä (rasva) olomuodossa. Lattialle joutuneen lian lämpötila tasapainottuu huoneen ja lattian lämpötilaan. Rasvan ja öljyn joukossa voi olla irtoroskia, ruuasta irronnutta proteiini- ja tärkkelyslikaa sekä vihanneksista ja hedelmistä peräisin olevia kuituja.

Yli 99 % kasvi- ja eläinperäisistä rasvahapoista on sitoutunut esterisidoksella glyseroliin. Rasvahapot eivät yleensä esiinny vapaina elävässä kudoksessa, sillä ne vuorovaikuttavat haitallisesti solukalvojen kanssa. Rasvahapot voivat olla sitoutuneina mono-, di- tai triestereiksi, jotka tunnetaan vastaavasti nimillä monoasyyloglyseroli, diasyyloglyseroli ja triasyyloglyseroli. Ruuan sisältämät rasvat ja öljyt ovat enimmäkseen triasyyloglyseroleja. [14]

Palvelualojen ammattiliiton [15] mukaan ravintoloiden ja ruokalojen keittiöissä lämpötila voi ylittää jopa 40 °C, vaikka suositeltava työskentelylämpötila on alle 25 °C. PAMin mukaan suositeltava ilman suhteellinen kosteus on 30–70 %. Rasvaisen lian puhdistus on yleensä helpompaa korkeammassa lämpötiloissa, kun rasvat ovat nestemäisessä muodossa [16], mutta puhdistusaineen tulisi toimia myös alle 25 °C lämpötilassa.

Ravintolan lattiapintaa ei voida pitää kauaa märkänä liukastumisvaaran vuoksi. Lattian liottamista vaikeuttaa myös veden haihtuminen ja veden valuminen pois halutulta kohdalta lattian kallistusten takia. Lattiapinnalla on siis melko kuivat olosuhteet. Koska lattia on pääasiallisesti kuiva ja se on kosketuksissa ilman kanssa, kyseessä on hapekkaat eli aerobiset olosuhteet.

Ravintoloissa siivouskoneiden käyttöä voivat hankaloittaa portaikot, pöytien ja tuolien jalat sekä keittiölaitteiden pyörät. Joissakin ravintoloissa siivous toteutetaan aamuisin kerran päivässä. Tällöin rasvainen lika on ehtinyt kuivua lattialla yön yli. Tahrat joutuvat joissakin paikoissa odottamaan lattialla viikonlopun yli.

Pinnan puhdistumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat puhdistusaineen, lian ja pinnan väliset kemiat sekä lämpötila, aika ja mekaniikka [16]. Ravintolan lattian puhdistusprosessissa pesuliuoksen lämpötila tasapainottuu huoneen ja lattian lämpötilaan, vaikutusaika lian kanssa on lyhyt ja siivouskoneiden käyttäminen on hankalaa.

Perinteisesti rasvaista likaa on poistettu kemiallisten reaktioiden avulla tuotetuilla pinta-aktiivisilla aineilla [16]. Kun puhutaan biologisista puhdistusaineista, tarkoitetaan yleensä entsyymejä tai mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita. Termi ”entsyymejä sisältävä puhdistusaine” löytyy standardoidusta puhtausalan sanastosta [17]. Tässä kandidaatintyössä käytetään termiä ”mikrobeja si-

sältävä puhdistusaine”, koska se on luonteva jatkumo standardoidulle termille ”entsyymejä sisältävä puhdistusaine”. Seuraavaksi käsitellään ensin lyhyesti perinteistä (luku 2.2) ja sitten biologista rasvanpoistoa (luvut 2.3 ja 2.4). Luvussa 3 käsitellään seikkaperäisemmin puhdistusaineiden sisältämiä mikrobeja.

2.2 Perinteiset puhdistusaineet

Ravintoloille tyypillisten olosuhteiden perusteella voidaan päätellä, että lämpötilan, ajan ja mekaanikan hyödyntäminen on ravintolalattian puhdistuksessa vähäistä. Tästä syystä puhdistuksessa täytyy hyödyntää puhdistusaineen, lian ja pinnan välisiä kemiallisia vuorovaikutuksia. Perinteisesti rasvaa on poistettu saippuoilla, alkoholeilla ja tensideillä, mitkä ovat kaikki pinta-aktiivisia aineita [16]. Puhdistusaineisiin on lisätty emäksisyyttä lisääviä ainesosia, jotka tehostavat pinta-aktiivisten aineiden toimintaa. Valitettavasti vahvasti emäksisillä aineilla voi olla haittapuolena sekä pintoja syövyttäviä että ympäristölle ja terveydelle vahingollisia ominaisuuksia [2].

Pinta-aktiiviset aineet sisältävät poolittoman osan (joka on lipofiilinen eli rasvaan hakeutuva) ja poolisen osan (joka on hydrofiilinen eli veteen hakeutuva). Lipofiilinen osa on yleensä alifaattinen tai aromaattinen hiilivety. Hydrofiilinen osa voi olla lähes mikä tahansa orgaaninen ryhmä, esimerkiksi karboksyylihappo, esterit, eetterit tai alkoholi. Se voi myös sisältää rikkiä, typpeä, fosforia tai halogeenia. [16]

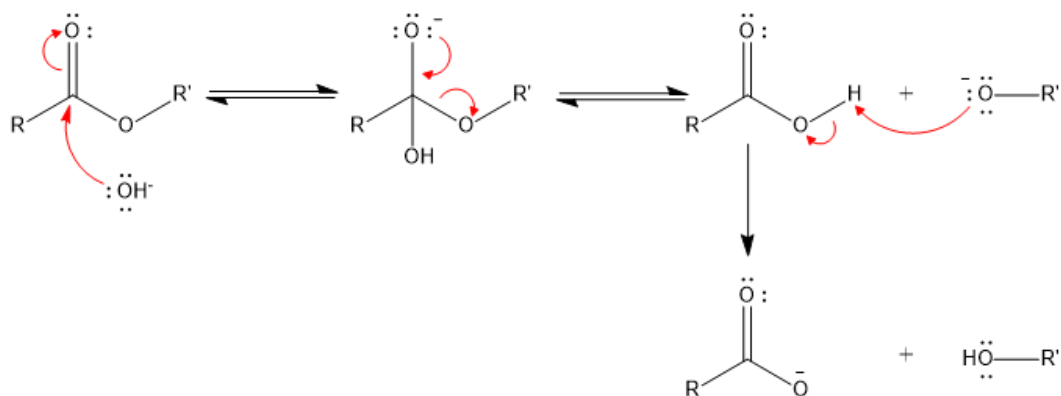
Pinta-aktiivisten aineiden avulla pyritään vähentämään eri aineiden välisiä jännitteitä. Puhtaan veden ja öljyn sisäiset vetovoimat ovat suuremmat kuin niiden toisiaan kohtaan kokemat vetovoimat, joten ne pysyvät omissa kerroksissaan. Pinta-aktiiviset aineet asettuvat vesi–öljy rajapinnalle. Hydrofiilinen osa osoittaa veteen päin ja lipofiilinen osa osoittaa öljyyn päin. Kun pinta-aktiiviset aineet alentavat öljy–vesiliuos ja vesiliuos–lattiapinta välisiä jännityksiä, vesiliuos voi tunkeutua öljyn ja lattiapinnan väliin pienemmällä työllä. Tämän ilmiön avulla öljy saadaan siirrettyä puhdistettavalta pinnalta liuokseen. [16]

Pinta-aktiiviset aineet kiinnittyvät eli adsorboituvat rajapinnalle, kunnes rajapinnalle ei voi adsorboitua enempää molekyyliä. Tämän jälkeen ne alkavat kasaantua esimerkiksi pallomaisiin muodostelmiin, joissa hydrofiiliset osat osoittavat ulos veteen päin ja lipofiiliset osat osoittavat pallon keskustaa kohti. Näitä muodostelmia kutsutaan miselleiksi. Konsentraatiota, jossa rajapinta on täynnä ja misellit juuri alkavat muodostua kutsutaan kriittiseksi misellikonsentraatioksi. Kriittisessä misellikonsentraatiossa öljynpoistokyky saavuttaa maksiminsa. Miselleillä on kuitenkin hyödyllinen kyky sitoa orgaanista ainetta ja estää sitä palautumasta takaisin puhdistetulle pinnalle. Orgaaninen aine sitoutuu misellin lipofiiliseen ytimeen, jolloin miselli turpoaa. [16]

Puhdistusaineisiin usein lisätään emäksisyyttä lisääviä ainesosia, koska ne tehostavat pinta-aktiivisten aineiden toimintaa. Pesuemäksistä käytetään myös nimitystä tehostaja (builder). Emäkset saavat aikaan OH⁻ -ioneja, jotka yleensä saavat lian ja puhdistettavan pinnan negatiivisesti varautuneiksi. Varaukset auttavat likaa pysymään paremmin liuoksessa. Ne myös neutraloivat

hapanta likaa, saippuoivat rasvaista likaa ja hajottavat proteiineja. Emästen avulla lika siis saadaan paremmin liukenevaan muotoon. [16]

Emäksisessä saippuoinnissa (katso kuva 1) OH^- -ioni hyökkää nukleofiilisesti johonkin asyyli glyserolin karbonyylihiileen, jolloin kaksoissidoksen elektronit siirtyvät hetkellisesti hapelle. Hapen elektronit palautuvat taas kaksoissidokseksi, ja koska alkyylioksidi on paras lähtevä ryhmä, alkyylioksidi irtaantuu. Koska lähtenyt alkyylioksidi on syntyneen karboksyylihapon konjugaattiemästä vahvempi emäs, se ottaa vastaan protonin ja jättää jälkeensä karboksylaatti-ionin. Reaktiossa syntynyt karboksylaatti-ioni ja alkoholi liukenevat asyyli glyseroleja paremmin veteen polaarisuutensa takia. Sama reaktio voi toistua, kunnes jäljelle jää vapaita rasvahappoja ja glyserolia. [18]



Kuva 1. Emäksinen saippuointi. Kuvassa R on rasvahapon hiilivetyketju ja R' on glyseroliosa. [18]

Lika pysyy liuoksessa joko hylkivien sähköisten voimien eli repulsioiden tai vesikerroksen ansiosta. Anioniset tensidit antavat pinnoille negatiiviset varaukset, jotka hylkivät toisiaan. Ionittomat tensidit keräävät ympärilleen vesikerroksen, mikä estää likaa laskeutumasta takaisin pinnalle tai kasaantumasta. [16] Perinteisellä rasvanpoistolla rasva siirretään pinnalta liuokseen ja liuoksen mukana viemäriin, minkä ongelmana on ollut viemärien tukkeutuminen ja hajuhaitat [19].

2.3 Entsyymejä sisältävät puhdistusaineet

Soluissa olevat entsyymit nopeuttavat soluissa tapahtuvia reaktioita alentamalla niiden aktivoitumisenergiaa. Entsyymit ovat useimmiten katalysoimilleen reaktioille erittäin valikoivia proteiineja. Ensimmäiset puhdistusaineissa käytetyt entsyymit eristettiin teurastetuista eläimistä jo 1910-luvulla, mutta ne olivat silloin vielä liian herkkiä puhdistusaineiden muille ainesosille. 1950-luvulta lähtien on kehitetty ja tuotettu stabiilimpia entsyymejä sopivien fermentoivien bakteerien avulla. [16, 20]

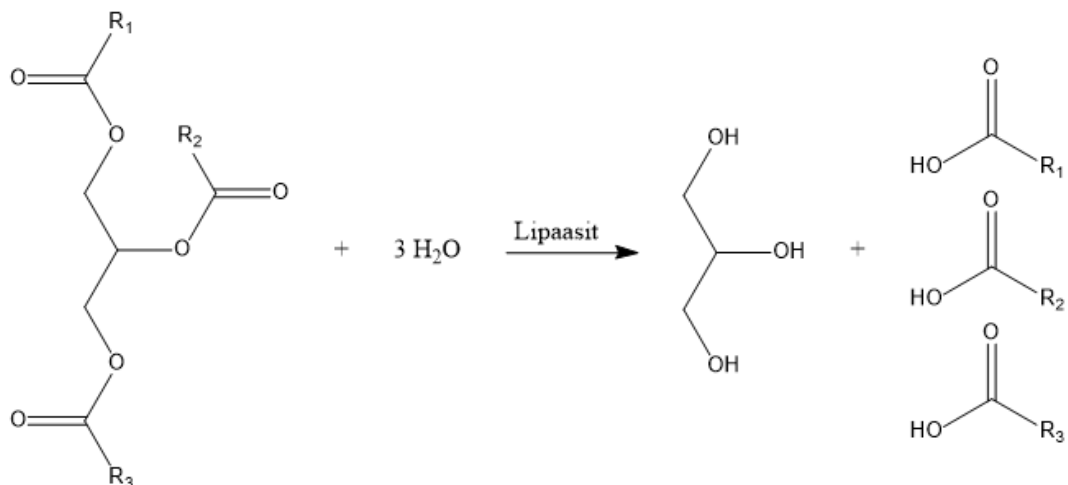
Entsyymit toimivat katalyyttisesti eli ne eivät itse kulu reaktiossa, minkä takia ne puhdistavat jo suhteellisen pienillä konsentraatioilla. Entsyymit ovat täysin biohajoavia, minkä takia niitä pidetään ympäristöystävällisinä. Ne toimivat perinteisiä puhdistusaineita alhaisemmissa lämpöti-

loissa, mikä mahdollistaa energian säästämisen. Joskus entsyymit ovat puhdistusaineissa korvaamattomia. Esimerkiksi proteaasientsyymien vaikutusta ei voida korvata lämpötilaa kohottamalla tai käyttämällä enemmän pesuainetta. [16]

Pesuaineissa käytetään ainakin neljän tyyppisiä hydrolysoivia (eli ne katalysoivat veden aiheuttaman sidoksen katkeamisen) entsyymejä: proteaasit, amylaasit, lipaasit ja sellulaasit. Ainetta johon entsyymi vaikuttaa kutsutaan substraatiksi. Proteaasit hajottavat proteiineja. Amylaasit hajottavat tärkkelystä. Lipaasit hajottavat rasvoja ja öljyjä. Sellulaasit hajottavat kuituja. Lipaasit hajottavat rasvaista likaa ja tehostavat tensidien toimintaa alhaisissa lämpötiloissa, jopa 20 °C:ssa. [16] Lipaaseja käyttämällä on joissakin pyykinpesuun liittyvissä tapauksissa voitu vähentää tensidien määrää 10–20 %. Ensimmäinen pesuainelipaasi kehitettiin vuonna 1988. [20]

Entsyymien käyttöä kovien pintojen puhdistuksessa on rajoittanut niiden hidas vaikutusaika ja tarve pitää pinta kosteana koko prosessin ajan [1]. Pinta täytyy pitää kosteana, jotta lämpöliike voi viedä substraattimolekyylin entsyymin aktiiviseen paikkaan ja reaktion tapahduttua siirtää entsyymin seuraavan substraattimolekyylin luokse. Tämä selittää myös toiminnan hitauden etenkin huoneen lämpötilassa, jossa lämpöliikettä on suhteellisen vähän. Entsyymien aktiivisuus usein kasvaa lämpötilan kasvaessa. [20]

Lipaasientsyymit katalysoivat asyyloglyserolien (rasvahappoja esterisidoksella kiinni glyserolissa) hydrolyysin. Kuvassa 2 on esitetty lipaasien katalysoima triasyyliglyserolin hydrolyysi lopulta rasvahapoiksi ja glyseroliksi [21]. Sekä rasvahapot että mono- ja diasyyloglyserolit ovat vesiliukoisempia kuin triasyyliglyserolit, koska niiden hydrofiilisen osan moolimassa suhteessa lipofiilisen osan moolimassaan on suurempi [16].



Kuva 2. Lipaasien katalysoima triasyyliglyserolin hydrolyysi glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi. R₁, R₂ ja R₃ voivat olla samanlaisia tai erilaisia rasvahappojen hiilivetyketjuja. [21]

Entsyymikatalysoidussa reaktiossa substraatti sitoutuu aluksi entsyymin aktiiviseen paikkaan. Entsyymi ja substraatti muodostavat yhdessä hetkellisesti kompleksin. Substraatin sidokseen kohdistuu entsyymin aiheuttamaa rasitusta, jonka avulla sidos katkeaa. Sidoksen katkeamisen

jälkeen lopputuotteet vapautuvat ja entsyymi palaa alkuperäiseen tilaansa valmiina katalysoidaan seuraavan reaktion. Itse reaktio, eli se kun substraatti sitoutuu entsyymiin ja sen jälkeen vapautuu lopputuotteina, voi kestää vain muutaman millisekunnin. [22]

2.4 Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet

Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet perustuvat elävien mikro-organismien kykyyn tuottaa likaa hajottavia entsyymejä ja hyödyntää hajonnutta likaa omassa aineenvaihdunnassaan. Tämä on etu perinteisiin puhdistusaineisiin ja entsyymejä sisältäviin puhdistusaineisiin verrattuna, koska lopputuotteet eivät aiheuta putkistoissa tukoksia tai hajuja. Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat entsyymejä sisältäviä puhdistusaineita stabiilimpia. Ne tuottavat monenlaisia entsyymejä tarpeen mukaan. Mikrobeja käyttämällä säästetään entsyymien eristämisestä aiheutuvat kustannukset. Toisaalta perinteisiin kemikaaleihin verrattuna mikrobien kasvattaminen maksaa. Mikrobeja sisältäviä tuotteita markkinoidaan ympäristöystävällisempinä, sillä ne eivät sisällä yhtä paljon syövyttäviä, terveydelle ja ympäristölle haitallisia ainesosia kuin perinteiset puhdistusaineet. [3] Toisaalta miedomprien ainesosien takia mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat perinteisiä tuotteita alttiimpia kontaminaatiolle ja pilaantumiselle [23]. Myös bakteerivirusten aiheuttama kontaminaatio on mahdollinen. Sen vaikutuksesta puhdistusaineen teho voi hävitä osittain tai kokonaan, koska virukset voivat tuhota liuoksessa olevat elävät bakteerisolut. Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden vaikutusaika on perinteisiä puhdistusaineita pitempi, sillä käyttöliuos levitetään pinnalle ja jätetään huuhtelematta [1].

1980-luvulta lähtien mikrobeja sisältäviä tuotteita on käytetty syömään orgaanista ainetta jätevesistä, putkista ja rasvanerottimista. Niitä on myös käytetty hajujen poistoon jätteiden käsittelyssä. 2000-luvun lähestyessä kehitettiin uudenlaisia pintojen puhdistusaineita, joiden aktiivisena ainesosana on elävät mikro-organismit. Vuoteen 2019 saakka mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat olleet enimmäkseen käytössä ammattimaisessa siivouksessa. [23] Hiljattain myös kuluttajamarkkinoille on tullut mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita. Ammattisiivouksessa tuotteita on käytetty hajujen poistossa, viemärien puhdistusaineina ja saniteettitilojen puhdistuksessa. Niitä on myös käytetty pintojen puhdistukseen tiloissa, joissa on suuret kävijämäärät. Tuotteita sairaaläkäyttöön on testattu viime vuosina. [3] Mikrobeja sisältäviä rasvanpoistoasemia on ollut käytössä mekaanikoilla [24] ja tuotteita löytyy myös hiilivedyistä koostuvien, teollisuudessa käytettyjen öljyjen poistoon (esimerkiksi [25]).

Suomessa mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita ammattikäyttöön valmistaa tai jälleenmyy ainakin Kiilto Oy [26–28], Protect Pipe Oy [29], Hitech Chemicals Finland Oy [30], Dimacon Oy (Probisolution) [31] ja Eko Eko Solutions Oy [25]. Suomessa mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita kuluttajille myy ainakin HomCare Finland Oy [32].

2.4.1 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen mekanismi

Suuri osa mikrobeja sisältävistä puhdistusaineista sisältää bakteereja itiömuodossa. Jotkin bakteerilajit muodostavat itiöitä selviytyäkseen kasville epäsuotuisista olosuhteista. Epäsuotuisia olosuhteita voivat olla esimerkiksi äärimmäiset lämpötilat, kuivuus tai ravinnon puute. Itiöitä voidaan ajatella lepomuotona tai lepovaiheena bakteerin elämänkaressa. Bakteerien itiöt voivat säilyä stabiilina käyttämättömässä puhdistusaineessa usean vuoden ajan. Kun tuotetta levitetään lian eli orgaanisen aineen päälle, itiöt voivat aktivoitua toimintakykyisiksi soluiksi ja toimia orgaanisen aineen hajottamiseksi. Jos mikrobi ei kykene muodostamaan itiöitä, se säilötään usein kuivaamalla tai kapseloimalla [33]. Vertailukelpoista informaatiota mikrobien elinvoimaisuudesta kapselointimenetelmien seurauksena ei ole saatavilla [34].

Spök et al. [3] vuonna 2018 sekä Norjan tieteellinen komitea elintarvikkeille ja ympäristölle (VKM) [34] vuonna 2019 kertoivat julkaisuissaan, että mikrobeja sisältäville puhdistusaineille ehdotettuja mekanismeja ei ole todistettu tieteellisesti. Käytännössä puhdistusaineen sisältämien mikrobien toimintaa voi olla vaikeaa ennustaa ilman käytännön tutkimuksia. Mikrobit vuorovaikuttavat ympäristön mikrobien kanssa. Sekä pesuaineen että ympäristön mikrobit voivat reagoida myös puhdistuksessa syntyviin hajoamistuotteisiin. Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden valmistajista osa sanoo, että tuotteen sisältämät mikrobit voittavat kilpailussa ei-toivotut mikro-organismit käyttämällä tehokkaammin saatavilla olevan ravinnon ja viemällä niiltä elintilaa. Myös antimikrobisten yhdisteiden tuottaminen ja vapauttaminen voi estää muiden mikrobisolujen kasvua tai tappaa muita mikrobeja. Mikrobien on myös arveltu estävän patogeenien kasvua vuorovaikuttamalla niiden muodostamien biofilmien kanssa.

Puhdistusaineissa käytetyt mikrobit kykenevät erittämään solujen ulkopuolisia entsyymejä, kuten proteaaseja, amylaaseja, sellulaaseja, lipaaseja ja ureaaseja [1, 3]. Mikrobit voivat erittää myös biologisia pinta-aktiivisia aineita [35]. Mikrobit voivat hyödyntää lipaasien avulla vapautettuja rasvahappoja aineenvaihdunnassaan β -oksidatio -prosessin ja sitruunahappokierron kautta [36]. Lopputuotteina on vettä ja hiilidioksidia.

2.4.2 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen tehon testaaminen

Arvanitakis et al. [2] vuonna 2018 sekä VKM [34] vuonna 2019 kertoivat julkaisuissaan, että mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden puhdistustehosta ei ole saatavilla vertailukelpoista tutkimustietoa. Tämä voi johtua standardoimattomien ja yleisesti hyväksytyjen testausmenetelmien puutteesta. Koska mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden puhdistustehosta ei ole saatavilla vertailukelpoista tutkimustietoa, testejä täytyisi suorittaa itse.

Tuula Suontamo [21] kehitti vuoden 2004 väitöskirjassaan menetelmän, joka voisi soveltua myös mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden puhdistustehon testaamiseen. Tutkimuslaitteistossa käytetään maalisuihkua lian levittämiseen kovalle laatalle, joka kulkee liukuhihnalla. Myös puhdistusaineen levittämiseen käytetään maalisuihkua. Laitteistoon on mahdollista liittää erilaisia pyyhkiä. Suontamon kehittämän laitteiston avulla voitaisiin järjestää esimerkiksi viikon kestävä koe,

jossa jokaisena päivänä suihkutetaan käytettyä paistoöljyä laatalle ja seuraavana aamuna suihkutetaan laatalle tutkittava puhdistusaine, joka jätetään huuhtelematta. Puhdistustehoa mitataan Suontamon menetelmässä laattojen valon heijastusominaisuuksien muutoksen perusteella. Mitauksissa käytetään spektrofotometriä, jolla mitataan valoisuutta (lightness) ja kiiltomittaria, jolla mitataan kiiltoa (gloss).

Tutkimuksessa voitaisiin verrata mikrobeja sisältävää puhdistusainetta samaan puhdistusaineeseen, josta on suodatettu solut ja itiöt pois. Tayabalin et al. [37] mukaan suodatus voitaisiin toteuttaa esimerkiksi 0,22 µm huokoskoon hydrofiilisellä polyeetterisulfoni suodattimella. Näin voitaisiin arvioida, kuinka paljon lisää puhdistustehoa tuotteeseen saadaan, kun lisätään siihen mikro-organismeja.

Lisäksi kaikkien puhdistusaineen sisältämien mikrobikantojen kyky kuluttaa rasvoja, tärkkelystä ja proteiinia tulisi analysoida erikseen. Tällä tavoin voitaisiin päätellä jokaisen mikrobikannan osuus puhdistusprosessissa. [23] Mikrobien lipaasiaktiivisuutta voidaan tutkia esimerkiksi Spirit Blue -agarin avulla. Lipaasiaktiivisuus ei kuitenkaan ole sama asia kuin puhdistusteho käytännön tilanteessa, joten on tärkeää suorittaa myös puhdistustehotestejä.

Hen et al. [19] suorittamassa tutkimuksessa seurattiin kahta rasvanerottajaa yli vuoden ajan. Vuorotellen 60 päivän jaksoissa he joko lisäsivät päivittäin mikrobeja, tai olivat lisäämättä. Tutkijat havaitsivat lisäysten seurauksena muutoksia sekä rasvanerottajan että rasvanerottajasta pois virtaavan effluentin mikrobiyhteisöissä. Mikrobiyhteisön muutoksella oli yhteys lisääntyneeseen rasvojen ja öljyjen kuluttamiseen.

2.4.3 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen konsentraatio

Pohjoismainen Joutsenmerkki on asettanut kriteerin, että mikrobeja sisältävän puhdistusaineen käyttöliuoksen tulee sisältää mikro-organismeja vähintään 1×10^5 pmy/ml [38]. Joutsenmerkin asettama raja-arvo kertoo, kuinka paljon mikrobeja vähintään tulee olla, jotta ne vaikuttavat tuotteen tehoon huomattavasti eivätkä ole mukana vain markkinointisyistä. Raja-arvo perustuu aineistoon, jota on kerätty tuottajilta ja yhteistyöhön Ecologon kanssa. Arvanitakis et al. [2] ottivat patenttihakemusten avulla selvää markkinoilla olevien tuotteiden mikrobikonsentraatioista. Taulukossa 1 on esitetty 8:n markkinoilla olleen mikrobeja sisältävän puhdistusaineen konsentraatiot.

Taulukko 1. Mikrobeja sisältävissä puhdistusaineissa käytettyjä konsentraatioita Arvanitakis et al. kirjallisuusselvityksen ja haastattelujen perusteella [2].

Tuote	Konsentraatio	Yksikkö
1	$5 \times 10^7 - 5 \times 10^9$	pmy/ml
2	$1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$	pmy/ml
3	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^9$	pmy/ml
4	10^6	pmy/ml
5	$10^5 - 10^8$	itiötä/ml
6	2×10^9	pmy/g
7	hiivat: 1×10^6 bakteerit: $1,4 \times 10^8$	pmy/g pmy/g
8	hiivat: 1×10^5 bakteerit: $1,5 \times 10^5$	solua/ml pmy/ml

Arvanitakis et al. selvityksen perusteella markkinoilla olevien puhdistusaineiden suurimmat mikrobikonsentraatiot ovat 10^9 pmy/ml suuruusluokkaa. On vaikeaa arvioida, mikä annostelu on sopivaa, koska vertailukelpoista informaatiota mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden puhdistustehosta ei ole saatavilla.

3. MIKROBEJA SISÄLTÄVIEN PUHDISTUSAINEIDEN AINESOSIA

3.1 Puhdistusaineissa käytettyjä mikrobeja

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden valmistajia ei tällä hetkellä veloiteta ilmoittamaan tuotteissa käytettyjä mikrobikantoja kuluttajille. Useat valmistajat pitävät käyttamiään mikrobikantoja liikesalaisuutena ilmoittaen ainoastaan, että tuote sisältää ihmiselle ja ympäristölle vaarattomia mikrobeja. Siksi on vaikeaa selvittää puhdistusaineiden tarkkaa sisältöä.

Työnantajaa veloitetaan kuitenkin tekemään riskinarvio biologisista tekijöistä, joille työntekijät altistuvat. Suomessa valtioneuvoston asetuksessa työntekijöiden suojelemiseksi biologisista tekijöistä aiheutuvilta vaaroilta [39] ohjataan jakamaan biologiset tekijät niiden aiheuttaman vaaran perusteella neljään riskiryhmään. Valtioneuvoston asetuksen kolmannessa pykälässä määritellään: ”1 ryhmään kuuluva biologinen tekijä ei todennäköisesti aiheuta sairautta ihmiselle eikä vaaraa työntekijän terveydelle” [39]. Samanlainen riskiluokitus on käytössä ainakin EU:ssa, Kanadassa ja Amerikassa [3]. Korkeamman riskiluokituksen ryhmiin kuuluvat mikrobit voivat aiheuttaa sairauksia ihmisille. Mikrobeja sisältävissä puhdistusaineissa tulisi käyttää ainoastaan riskiryhmään 1 kuuluvia mikrobeja. Suomessa sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus biologisten tekijöiden luokituksista [40] listaa mikrobit, joiden riskiluokitus on 2 tai korkeampi. Lista on päivitetty viimeksi vuonna 2010. Kanadassa on luotu helppokäyttöinen internethakukone nimeltä ePathogen, jossa voi hakea mikrobin nimen avulla siihen liittyvän riskiluokituksen [41]. EFSA (European Food Safety Authority) on julkaissut listan QPS-mikrobeista (Qualified Presumption of Safety), joita voidaan turvallisesti lisätä ruokaan. QPS-lista on viimeksi päivitetty vuoden 2019 alussa [42].

Food and Chemical Toxicology -lehestä julkaistiin vuonna 2018 erikoisnumero, joka sisältää sekä kirjallisuusselvityksen [2] että erilaisia tunnistustestejä [23, 43], joiden avulla tunnistettiin markkinoilla olevien puhdistusaineiden mikrobeja. VKM [34] julkaisi vuonna 2019 raportin, jossa kerrottiin, mitä mikrobeja puhdistustuotteet ovat sisältäneet. Näiden selvitysten tuloksia käsitellään seuraavissa kappaleissa.

Kirjallisuusselvityksessään Arvanitakis et al. [2] tutkivat, mitä mikrobeja puhdistusaineisiin on lisätty. Selvityksessä käytiin läpi julkisesti saatavilla olevaa tietoa, kuten patenttihakemuksia ja valmistajien internetsivuja. Selvityksessä löydettiin suuntaa antavia tietoja 18 puhdistusaineen mikrobisällöstä. Patenttihakemukset olivat yhtä poikkeusta lukuun ottamatta 2000-luvulta tai uudempia. Kaikki myynnissä olleet tuotteet sisälsivät ainakin *Bacillus*-suvun bakteereja. Osa tuotteista sisälsi Japanissa 1982 kehitetyn Effective Micro-organisms® -tavaramerkin mukaisia mikrobeja, jotka ovat yleensä seos maitohappobakteereja, fototrofia bakteereja, hiivoja, fermentoivia sieniä ja aktinobakteereja [44, 45]. Maitohappobakteereista *Bifidobacterium*-suvun jäsenet ovat obligaatisti anaerobisia eli ne eivät teoriassa selviä lattiaan hapekkaissa olosuhteissa [34]. Maitohappobakteerit erittävät happoa, joka laskee pH:ta niiden läheisyydessä. pH:n laskeminen

ei vaikuta edulliselta rasvaisen lian poistamisessa, koska emäksiset olosuhteet auttavat saippuomaan rasvaista likaa. Toisaalta maitohappobakteerit viihtyvät happamassa ympäristössä, ja hapan ympäristö on todennäköisesti tärkeä maitohappobakteerien entsyymien toiminnalle.

Teasdale ja Kademi [23] tunnistivat 28 puhdistusaineen sisältämiä mikrobeja. Tuotteet olivat myynnissä Euroopassa, Pohjois-Amerikassa ja Japanissa vuosina 2014–2018. He tunnistivat mikrobeja viljelymenetelmien ja mikrobien ominaisuuksien avulla. He käyttivät myös API-liuskoja (Analytical Profile Index), joissa on yhdelle liuskalle kerätty sarja tunnistustestejä, joiden yhdistelmän avulla mikrobilaji voidaan tunnistaa nopeasti. Testien perusteella *Bacillus subtilis* oli läsnä kaikissa tuotteissa ja 79 % tuotteista sisälsi *Bacillus amyloliquefaciensia*, joka on *B. subtilis*in läheinen sukulainen. Muita *Bacillus*-suvun lajeja oli läsnä satunnaisesti. Osa puhdistusaineista sisälsi koliformisia bakteereja (sekä *Pseudomonas*-suvun jäseniä että *Enterobacteriaceae*-heimon jäseniä). Tämän pääteltiin johtuvan tuotteiden saastumisesta eikä koliformisten bakteerien tarkoituksellisesta lisäämisestä puhdistusaineisiin.

Subasinghe et al. [43] tunnistivat viljelymenetelmien ja mikrobien DNA:n tunnistusjaksojen emäsjärjestyksen määrittämisen avulla 5 puhdistusaineen sisältämiä mikrobeja. Tutkimuksessa mukana olleita tuotteita valmistettiin ja myytiin Pohjois-Amerikassa. Tutkimuksessa havaittiin, että kaikissa tuotteissa oli yksinkertaisia bakteeriseoksia. *Bacillus*-suvun lajeja löytyi kaikista tuotteista. Tuotteista löytyneitä bakteerilajeja olivat *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. flexus* ja *B. megaterium*. Osassa tuotteista oli mukana myös hiivoja ja ainakin sieni *Aspergillus oryzae*.

VKM [34] julkaisi vuonna 2019 raportin, joka sisälsi kirjallisuusselvityksen, jossa selvitettiin, minkälaisia mikrobeja puhdistusaineisiin on lisätty. Kirjallisuusselvitys rajoittui vuosina 2014–2019 julkaistuihin artikkeleihin. Myös VKM havaitsi, että puhdistusaineissa yleisimmät mikro-organismit ovat *Bacillus*-suvun jäseniä. Seuraavaksi yleisimpiä ovat suvut *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Rhodopseudomonas* ja *Saccharomyces*. Monia muitakin mikro-organismeja on käytetty.

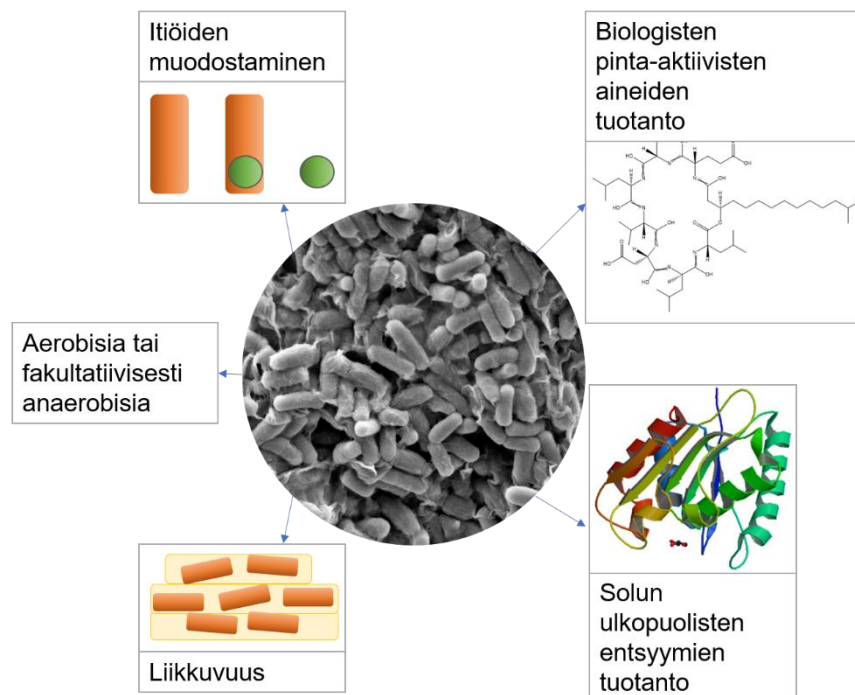
Geneettisesti muunneltuja mikrobeja ei testien perusteella ole käytetty puhdistusaineissa. Niiden käyttöä ei voida kuitenkaan rajata pois vähäisten tietojen takia. Pohjoismainen Joutsenmerkki määrittää kriteereissään, että puhdistusaineen sisältämät mikro-organismit eivät saa olla geneettisesti muunneltuja [38].

Kantakokoelmista, kuten ATCC (American Type Culture Collection), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) tai CBS-KNAW (Centralbureau voor Schimmelcultures – Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen) on saatavilla hyväksytyillä menetelmillä valmiiksi tunnistettuja puhtaita bakteerikantoja [46]. Esimerkiksi suomalainen yritys Protect Pipe Oy kertoo, että sen tuotteiden sisältämät bakteerit viljellään eri puolilla Eurooppaa, minkä jälkeen ne sekoitetaan ja pakataan Suomessa [29].

3.2 Puhdistusaineissa käytettyjen mikrobien ominaisuuksia

Luvussa 3.1 viitattujen tutkimusten perusteella lähes kaikissa markkinoilla olevissa puhdistusaineissa käytetään *Bacillus*-suvun bakteereja. Luvussa 3.2 kerrotaan ensin *Bacillus*-suvusta yleisesti ja sen jälkeen joistakin *Bacillus*-suvun lajeista. Tässä kandidaatintyössä ei voida käsitellä kaikkien puhdistusaineissa käytettyjen mikrobien ominaisuuksia, koska lajeja on paljon ja tämän työn kannalta olennaista tietoa on haastavaa löytää.

Bacillus-sukuun kuuluu satoja lajeja. Sukuun kuuluu sekä riskiryhmän 1 ei-patogeenisia että riskiryhmien 2 ja 3 patogeenisia bakteereja. [43] Ei-patogeenisia *Bacillus*-suvun lajeja on sisällytetty EFSA:n QPS listaan eli niitä voidaan pitää turvallisina [42]. *Bacillus*-suvun bakteerit ovat itiöitä muodostavia, Gram-positiivisia ja muodoltaan sauvamaisia. Ne ovat enimmäkseen aerobisia, mutta myös fakultatiivisesti anaerobisia bakteereja eli ne viihtyvät hapekkaissa, mutta pystyvät selviämään hapettomissakin olosuhteissa. Luonnossa niitä esiintyy maaperässä. Monet *Bacillus*-suvun jäsenet tuottavat solun ulkopuolelle entsyymejä, jotka hydrolysoivat rasvoja ja öljyjä, polysakkarideja ja nukleiinihappoja. Monet *Bacillus*-suvun jäsenet tuottavat antimikrobisia yhdisteitä. [22] Kuvassa 3 on esitetty joidenkin *Bacillus*-suvun lajien ominaisuuksia, joista voi olla hyötyä kovalle pinnoille tarkoitetuissa puhdistusaineissa.



Kuva 3. Kovan lattiapinnan puhdistukseen tarkoitetun aineen sisältämälle mikrobille hyödyllisiä ominaisuuksia, joita joillakin *Bacillus*-suvun lajeilla on. Keskellä olevassa kuvassa näkyy *Bacillusten* sauvamainen muoto. Koottu lähteistä [22, 35, 47].

Bacillus subtilis subsp. subtilis on eräs yleisimmistä puhdistusaineissa käytetyistä lajeista [2]. Sitä on käytetty myös muun muassa entsyymien tuotannossa ja elintarviketeollisuuden käymisprosesseissa. *B. subtilis* tuottaa myös biologista pinta-aktiivista ainetta nimeltä surfaktiini. [35] Jotkin *B.*

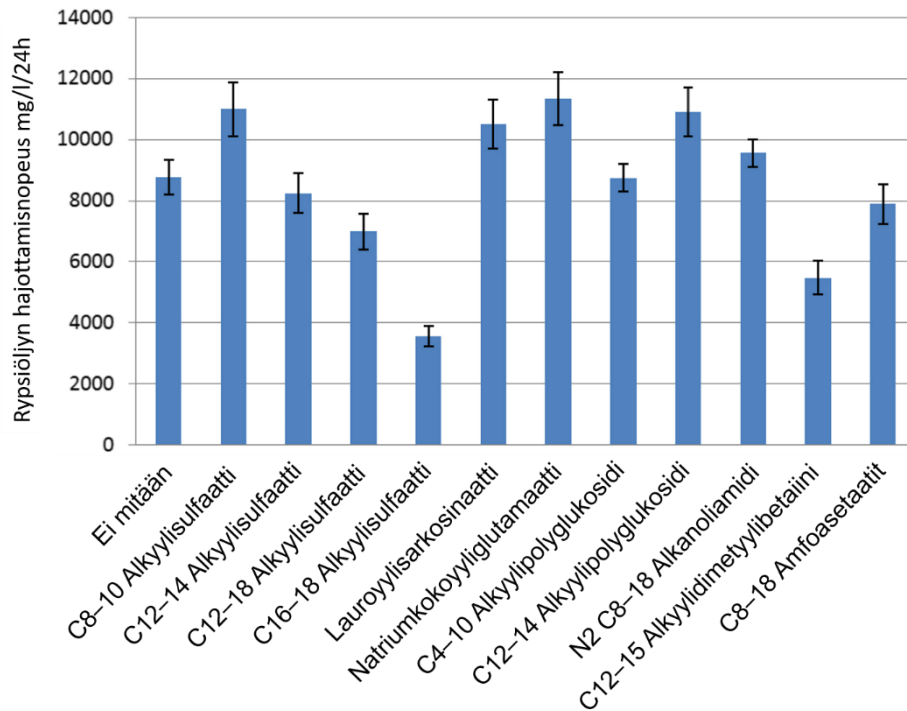
subtilis kannat kykenevät liikkumaan puolikiinteillä pinnoilla ja pystyvät muodostamaan biofilmejä ([48], katsottu [49]). *B. licheniformis* on ollut käytössä ainakin emäksisiä olosuhteita sietävän amylaasin tuotannossa [50]. *Bacillus flexus* on alkalifili eli sen optimikasvuolosuhteet ovat emäksiset ja se kykenee tuottamaan emäksisiä olosuhteita kestäviä lipaaseja. Sen tuottamaa lipaasia on harkittu lisättäväksi pesuaineisiin. [43, 51]

Tzirita et al. [52] toteuttivat vuonna 2018 julkaistun tutkimuksen, jossa pelkkiä *Bacilluksia* sisältävä tuote ei kyennyt hajottamaan voita. Kun tuotteeseen lisättiin *Pseudomonas putida* -kanta, voi hajosi. Tästä pääteltiin, että *Bacillukset* tuottivat lipaaseja, jotka hajottivat triasyyliglyserolia rasvahapoiksi ja *Pseudomonas putida*, joka ei itse tuota lipaaseja käytti rasvahappoja aineenvaihdunnassaan. *Pseudomonas putida* on sauvamainen, flagellan omaava, Gram-negatiivinen ja aerobinen bakteeri. Sen optimikasvulämpötila 25–30 °C on lähellä huoneen lämpötilaa, ja se voidaan helposti eristää. Kun pohditaan sen sopivuutta puhdistusaineeseen, on huomioitava, että *Pseudomonas putida* ei muodosta itiöitä. Se täytyisi siis säilyttää stabiilissa muodossa ja lisätä puhdistusaineeseen juuri ennen käyttöä.

3.3 Muita ainesosia mikrobien lisäksi

Mikrobien toimintaan perustuvat puhdistusaineet sisältävät usein mikrobien lisäksi muitakin ainesosia, kuten pinta-aktiivisia aineita, säilöntäaineita, entsyymejä, hajusteita, liuottimia tai hankaavia aineita. Lisäaineet voivat heikentää tai parantaa mikrobien elinvoimaisuutta ja kykyä kulluttaa likaa.

Teasdale ja Kademi [23] osoittivat vuonna 2018 julkaistussa tutkimuksessa, kuinka eri pinta-aktiiviset aineet vaikuttavat joko positiivisesti, neutraalisti tai negatiivisesti erään *B. amyloliquefaciens* -kannan kykyyn hajottaa rypsiöljyä. Ihanteellista olisi löytää pinta-aktiivinen aine, joka hajottaa rasvaisen lian mikrobeille helpommin hyödynnettävään muotoon, aiheuttamatta stressiä itse mikrobeille. Teasdalen ja Kademin kokeen tulokset on esitetty kuvassa 4. On otettava huomioon, että tulokset eivät ole suoraan sovellettavissa kovan lattiapinnan puhdistukseen huoneenlämpötilassa, koska mikrobit olivat kokeen ajan öljyseokseen upotettuina 30 °C:n lämpötilassa.



Kuva 4. *B. amyloliquefaciens* -kannan rypsiöljyn hajottamisnopeus erilaisten pinta-aktiivisten aineiden kanssa. Mikrobit olivat kokeen ajan öljyseokseen upotettuina ja 30 °C:n lämpötilassa. [23]

Esimerkiksi Protect Pipe Oy kertoo käyttävänsä alkoholeja C7–C21 poistamaan pintajännitettä [29]. Esimerkiksi HomCaren BioSwipe Multi Clean Basic -tuotteessa on mikro-organismien lisäksi anionisia tensidejä, ionittomia tensidejä ja biologista pinta-aktiivista ainetta nimeltä surfaktiini [32]. Eräs kanadalainen patentti vuodelta 2002 ehdottaa (ammonium)lignosulfonaatin ja mikro-organismien yhdistelmää hiilivetyjen puhdistamiseen [53]. Lignosulfonaattien ja mikrobien yhdistelmän kerrotaan tehoavan myös rasvoihin, öljyihin ja tärkkelykseen. Yhdistelmä voisi kiinnostaa Suomen puhdistusainevalmistajia, sillä lignosulfonaatteja saadaan usein paperiteollisuuden sivuvirtoina. Kyseisessä patentissa on mainittu, että tuote toimii lämpötilavälillä 4–45 °C.

Säilöntäaineita lisätään tuotteeseen estämään ei-toivottujen mikrobien kasvua. Esimerkiksi Kiilto Oy on käyttänyt säilöntäaineina ainakin bentsisotiatsolinonia, metyyli-isotiatsolinonia ja lauryyliamiini dipropyleenidiamiinia [27]. Esimerkiksi Protect Pipe Oy on käyttänyt säilöntäaineena ainakin 1,2-bentsisotiatsolin-3-onia. Esimerkiksi Ecolab on käyttänyt säilöntäaineena boorihapon suoloja [54]. Säilöntäaineita valitessa täytyy varmistaa, että aine ei ole vaaraksi tuotteeseen tarkoituksella lisättyjen mikrobien elinvoimaisuudelle [23].

Puhdistusaineisiin lisättyjen entsyymien tarkoitus on katalysoida hydrolyysireaktioita. Jos entsyymejä on lisätty pesuaineeseen jo valmiiksi, ei mikrobien tarvitse tehdä työtä tuottaakseen tuota entsyymiä. Eräessä patentissa mikrobiliuokseen oli lisättyä glyserolia, joka teki tuotteesta mukavampaa käsitellä [45]. Eräessä 90-luvun patentissa kuvailtiin tuotetta, johon oli lisätty hankkavia aineita [55]. Tuote voi sisältää hajusteita, jotta työskentely olisi miellyttävämpää [28]. Useat liuottimet ja kelatoivat aineet voivat huonontaa itiöiden elinvoimaisuutta [23].

4. TURVALLISUUS, YMPÄRISTÖ JA LAATU

4.1 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen terveysvaikutukset

Spök et al. [3] toteavat vuonna 2018 julkaistussa artikkelissa, että tähän mennessä ei ole raportoitu sairastapauksista, jotka olisivat liittyneet mikrobeja sisältäviin puhdistusaineisiin (kirjoittajien parhaan tiedon mukaan). Tällä hetkellä tutkittua tietoa mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden terveysvaikutuksista on kuitenkin vähän.

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden terveysvaikutuksia arvioitaessa tulee ottaa huomioon [2, 34]:

- a) mikrobien ominaisuudet,
- b) tuotteen formulointi, laatu ja käyttötavat sekä
- c) ihmisryhmät, joihin riski kohdistuu.

Oleennaista on tunnistaa mikrobin taksonomia luotettavasti ja sen jälkeen tunnistaa mikrobin mahdollinen kyky tuottaa myrkyllisiä metaboliitteja, tai allergeeneja. Kun tiedetään, että kaikki lajiin kuuluvat kannat ovat vaarattomia, on riittävää tunnistaa mikrobin laji. Toisinaan samasta lajista löytyy sekä turvallisia että patogeenisiä kantoja. Tällöin taksonominen tunnistaminen tulisi ulottaa kantatasolle asti. Tuotteen laadunvalvonta on tärkeää, jotta se ei sisällä patogeeneja. Tuotteen laadun merkityksestä kerrotaan enemmän luvussa 4.3. Patogeenisten mikrobien resistenssi antimikrobisia aineita vastaan on maailmanlaajuinen huolenaihe. Resistenssigeenejä omaavien kantojen laajamittainen käyttö, vaikka ne eivät itse ole vaarallisia, voisi mahdollisesti edesauttaa resistenttien patogeenisten bakteerikantojen leviämistä. Siksi on tärkeää ottaa resistenssigeenit huomioon riskien arvioinnissa.

B. subtilis ja sen läheiset sukulaiset, esimerkiksi *B. licheniformis* ja *B. pumilus*, ovat yleisesti harmittomana pidettyjä bakteereja [34]. Näihin lajeihin liittyviä harvinaisia ruokaperäisiä sairastumisia on raportoitu [56]. Esimerkiksi *B. licheniformis* kuuluu riskiryhmään 1, mutta joidenkin lajiin kuuluvien kantojen on osoitettu tuottavan toksiineja, jotka yhdistettiin vauvan ruokamyrkytystapaukseen [57]. Siksi se on esimerkki mikrobista, jonka taksonomia on tärkeää tunnistaa kantatasolle asti. Joidenkin *B. subtilis* ryhmän jäsenten on raportoitu aiheuttavan, hyvin harvoin, ihmisissä herkistymistä keuhkofibroosiin [37]. Tietoa on saatavilla vähän, mutta huolia on esitetty myös joidenkin *Bacillus*-sukuun kuuluvien kantojen resistenssigeeneistä, jotka voisivat siirtyä solujen välillä [58, 59].

Työntekijät ja asiakkaat voivat altistua mikrobeja sisältäville puhdistusaineille ihon, hengityksen tai nielemisen kautta. Mikrobien riskiluokittelussa ei oteta erikseen huomioon negatiivisille terveysvaikutuksille erityisen alttiita ihmisryhmiä. Negatiivisille terveysvaikutuksille alttiita ihmisryhmiä ovat esimerkiksi immuunivajavaiset, vauvat, vanhukset ja raskaana olevat naiset. Myös hei-

dät tulisi ottaa huomioon, kun suunnitellaan puhdistusprosessia. Puhdistusaineita käytetään si- sätiloissa ja toistuvasti, joten pitkän aikavälin altistuminen on todennäköistä. Lattiapintojen puh- distamiseen on olemassa sekä sumutettavia että levitettäviä aineita. On mahdollista, että mikro- beja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä joutuu myös ilmaan mikrobeja, eli syntyy bioaero- soleja. Tieteellisestä kirjallisuudesta löytyy ainakin kolme erilaista tutkimusta [24, 37, 60], jotka käsittelevät mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä syntyviä bioaerosoleja. Viitatuissa kolmessa tutkimuksessa tultiin kaikissa siihen tulokseen, että altistuminen bakteereille hengityk- sen kautta ei ole merkittävä huolenaihe. Seuraavat kolme kappaletta kertovat viitatuista tutkimuk- sista tarkemmin ja taulukossa 2 on niistä yhteenveto.

Tayabali et al. [37] tutkivat hiirten avulla erään mikrobeja sisältävän puhdistusaineen mahdolli- sesti allergisoivia tai herkistäviä ominaisuuksia. Tutkimuksessa mukana ollut tuote oli tarkoitettu lemmikki-peräisten hajujen poistoon. Tutkimusryhmä altisti koe-eläimiä puhdistusaineelle kahden viikon ajan. Tuote sisälsi $2,1 \times 10^6 \pm 30,7$ % pmy/ml mikrobeja. Tuotteessa mukana olleiksi kan- noiksi tunnistettiin ainakin *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. flexus* ja *B. at- rophaeus*. Eniten tuote sisälsi lajeja *B. flexus* ja *B. licheniformis*. Tutkimusryhmän loppupäätelmä oli, että puhdistusaine ei yksinään aiheuttanut hiirille allergista reaktiota. Kun hiiret altistettiin sekä puhdistusaineelle että pölypunkkeille, havaittiin hiirten herkistyminen pölypunkki-allergialle. Sama koe suoritettiin myös suodatetulla puhdistusaineella, jossa ei ollut enää soluja eikä itiöitä. Ko- keissa saatiin sama lopputulos. Tämän perusteella pääteltiin, että puhdistusaineen sisältämät bakteerit eivät toimineet herkistäjinä. Herkistäjinä toimivat puhdistusaineen muut ainesosat. Her- kistäjinä toimivat mahdollisesti puhdistusaineen sisältämät pinta-aktiiviset aineet.

Berg et al. [60] tutkivat kokolatiamaton puhdistuksesta ja tahrannoistosta aiheutuvia bioaero- soleja 4,62 m x 4,62 m x 2,43 m kokoisessa huoneessa. Tutkimuksessa käytettiin mikrobilajeja *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* ja *B. licheniformis*. Ohjeavoksi tutkimusryhmä valitsi tieteellisen kirjallisuuden ja kanadalaisen työturvallisuutta tutkivan IRSST:n (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail) suosituksen mukaan, että ei-patogee- nisia mikro-organismeja pitäisi olla ilmassa alle 10^4 pmy/m³. EFSA suosittelee ei-teollisille työpai- koille ilmassa olevien ei-patogeenisten mikro-organismien rajaksi $\leq 1,0 \times 10^3 - 7,0 \times 10^3$ pmy/m³. Pa- togeenisille bakteereille suositus on aina 0 pmy/m³. Tutkimuksessa havaittiin, että ilman baktee- ripitoisuus säilyi alle ohjearvojen, lukuun ottamatta lyhytkestoista arvon ylitystä tahrannoiston yh- teydessä. Artikkelissa huomautetaan myös, ettei ole tieteellisesti todistettu, että *Bacillus-suvun* bakteerit tai muut bakteerit yksinään aiheuttavat hengitysteiden herkistymistä. Entsyymien on to- dettu aiheuttavan allergisia reaktioita. Tutkijaryhmän arvion mukaan entsyymien määrä, jonka tässä koejärjestelyssä mikrobit teoriassa pystyisivät tuottamaan, ei aiheuta syytä huoleen.

Villeneuve et al. [24] tutkivat bioaerosoleja, joille mekaanikot altistuvat mikrobeja sisältävien ras- vanpoistoasemien käytön yhteydessä. Mikrobeja sisältävän rasvanpoistoaseman puhdistusaine sisälsi ennen käyttöä ainoastaan *B. subtilis* -lajin bakteereja. Käytön myötä aineeseen sekoittui muita bakteerikantoja. Likaantuneesta tuotteesta löydettiin hiivoja ja esimerkiksi *Pseudomonas*

aeruginosa -lajin bakteereja. *Pseudomonas aeruginosa* kuuluu riskiryhmään 2. Koska *P. aeruginosa* voi aiheuttaa ihoinfektioita, tutkimusryhmä suositteli työntekijöille suojakäsineiden käyttöä. Koska roiskeet ovat mahdollisia, suositeltiin käyttämään suojalaseja. Hengityssuojaimille ei tutkimuksen mukaan ollut tarvetta, koska työntekijät altistuivat hyvin alhaisille pitoisuuksille ilmassa olevia bakteereja. Ilmassa olevien bakteerien maksimipitoisuus oli $4,8 \times 10^2$ pmy/m³, joka on selvästi alle esimerkiksi IRSST:n suosituksen 10^4 pmy/m³.

Taulukko 2. Yhteenveto kolmesta mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden terveysvaikutuksiin liittyvästä tutkimuksesta.

Tutkimus	Bakteerit	Huolenaihe	Päätelmät
Tayabali et al. [37]	<i>B. flexus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. atrophaeus</i>	Allergiat, hengitysteiden herkistyminen.	Tuote ei yksinään aiheuttanut herkistymistä hiirissä. Tuotteen sisältämät bakteerit eivät toimineet herkistäjinä. Tuotteen muut ainesosat herkistivät pölypunkki-allergialle.
Berg et al. [60]	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. licheniformis</i>	Bioaerosolit kokolattiamaton puhdistuksessa.	Kokolattiamaton puhdistuksesta ei leviä yli 10^4 pmy/m ³ mikrobeja huoneilmaan, paitsi hetkellisesti tahrannoitossa.
Villeneuve et al. [24]	<i>B. subtilis</i> (aluksi, mutta käytön myötä likaantuneessa tuotteessa oli läsnä monia lajeja)	Bioaerosolit biologisten rasvanpoistoasemien käytössä.	Työntekijöiden ei tarvitse käyttää hengityssuojausta, koska ilmassa on alhainen pitoisuus bakteereja. Iho on suojattava likaantuneen tuotteen sisältämien patogeenien takia.

Tutkimuksia on viime vuosina tehty myös mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä sairaalaympäristössä. Tässä kandidaatintyössä ei käsitellä sairaalaympäristöön liittyvää puhdistusta.

4.2 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen ympäristövaikutukset

Mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita markkinoidaan ympäristöystävällisempänä vaihtoehtona perinteisille puhdistusaineille. Spökin et al. [3] suorittama vertailu osoitti, että useimmat mikrobeja sisältävät puhdistusaineet sisältävät paljon vähemmän happeja ja pinta-aktiivisia aineita. Mikrobeja sisältävät viemärien, putkien ja rasvanerotajien puhdistajat ovat vähemmän emäksisiä ja vaikuttaa siltä, että niiden avulla voidaan vähentää orgaanisten liuottimien tarvetta.

Biologisten tekijöiden luokittelu riskiryhmiin Euroopan unionissa ottaa huomioon ainoastaan ihmisiin kohdistuvat uhkat. Kanadassa mikrobit luokitellaan riskiryhmiin myös eläimiin kohdistuvan uhkan perusteella. VKM:n [34] raportin mukaan tutkimustietoa puuttuu mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden vaikutuksesta eläimiin maalla ja vesissä. Kuten mainittiin luvussa 4.1, hiirien avulla toteutetussa eläinkokeessa puhdistusaineen suodoksen todettiin herkistävän allergiaan pölypunkeille.

De Cesare et al. [61] toteuttivat tutkimuksen, jossa puhdistettiin broilerin kasvualustana käytettyä kierrätettyä kananlantaa mikrobeja sisältävällä puhdistusaineella. Puhdistusaine sisälsi mikrobilajeja *B. subtilis*, *B. pumilus* ja *B. megaterium*. *Bacillus*-suvun bakteerit onnistuivat kasvamaan kierrätetyssä kananlannassa. Uuden mikrobilajin lisääminen vähensi *E. colin* määrää kanojen ruuansulatuselimistössä, mutta bakteerien diversiteetti säilyi. Tällä pääteltiin olevan positiivinen vaikutus tutkimuksen broilerin terveyteen.

Lattianpesuun käytettävät puhdistusaineet päätyvät lopulta viemäriin. Viemärien kautta jätevedet päätyvät lopulta jäteveden puhdistamoihin ja vesistöihin. VKM [34] pohti raportissaan, pystyykö puhdistusaineen sisältämä bakteerikanta selviämään luonnon vesistössä ja pystyykö se muuttamaan vesistön alkuperäistä ekosysteemiä. Raportissa tunnistettiin, että asiasta tarvitaan lisää tutkimustietoa. *Bacillus*-suvun itiöt kestävät koviakin olosuhteita. Ennen vesistöön joutumista on kuitenkin monia esteitä. Putkistoissa on mahdollisuus tulla saalistetuksi tai tarttua pinnoille ja jätevedenpuhdistamolla on monenlaisia prosesseja, joissa mikrobeilla on mahdollisuus poistua vedestä tai kuolla. Jos kuitenkin mikrobeja pääsee luonnon vesistöihin, niin niiden on uutena lajina vaikea menestyä, koska luonnon vesistö on ympäristönä tyypillisesti niukkaravinteinen ja lokeroitunut. Toisaalta *Bacillus*-suvun bakteereja esiintyy luonnossa maaperässä, joten ne eivät välttämättä olisi ympäristölle uusi laji. Raportissa pääteltiin, että riski negatiivisesta vaikutuksesta ympäristön mikrobitasapainoon on vähäinen.

4.3 Mikrobeja sisältävän puhdistusaineen laadunvalvonta

Laadunvalvonnan avulla voidaan varmistaa, että jokainen erä puhdistusainetta sisältää tehokkaan suorituskyvyn edellyttämän konsentraation elinvoimaisia mikrobeja. Pakatussa tuotteessa ei saa olla patogeeneja, ja mikrobin tulee säilyä elinvoimaisena pakkauksessa ilmoitettu aika. Koska mikrobeja sisältävissä puhdistusaineissa ei ole vahvoja kemikaaleja, ne ovat perinteisiä kemikaaleja alttiimpia pilaantumiselle [23].

Alankomaiden ruoka- ja kuluttajatuotteiden turvallisuusviranomaisen NVWA (Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority) ([62], katsottu [3]) tunnisti raportissaan vuonna 2004, että markkinoilla olleiden mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden laadussa oli vaihtelua. Puhdistusaineissa olevien itiöiden elinvoimaisuus ja saastumisen aste vaihtelivat. Nämä hygieniaongelmat ja se, että osa tuotteista saattoi sisältää opportunistisia patogeeneja, sai NVWA:n suosittamaan, että mikrobeja sisältäviä puhdistusaineita ei käytetä alueilla, joilla käsitellään ruokaa. Myös pohjoismainen Joutsenmerkki vaatii mikro-organismeja sisältävien tuotteiden etikettiin merkinnän, jossa ohjeistetaan, että tuotetta ei saa käyttää elintarvikkeiden kanssa kosketuksissa olevilla

pinnoilla [38]. Tarkka mikrobien taksonominen tunnistaminen ja huolellinen laadunvalvonta ovat tärkeitä, jotta tuotteita voidaan käyttää alueilla, joilla käsitellään ruokaa.

On yleinen toimintatapa varmistaa jokaisen tuotteeseen lisättävän mikrobikannan biokemiallinen profiili API-liuskojen avulla [23]. Menetelmä ei ole yhtä tarkka kuin mikrobin DNA:n tunnistusjaksosten emäsjärjestyksen määrittämiseen perustuvat menetelmät, mutta se on helpompi ja nopeampi. Menetelmässä valitaan joitakin kannasta tehdyn hajotusviljelmän pesäkkeitä ja analysoidaan ne API-liuskojen avulla. Kaikkien valittujen pesäkkeiden tulosten pitäisi olla identtiset ja johdonmukaiset. Kaikkien tulosten pitäisi myös vastata emokantaa. Tämä toimintatapa on toimiva ainoastaan, kun emokanta on tunnistettu hyväksytyillä menetelmillä. Tärkeää on myös säilyttää emokantaa siten, että luonnollisen evoluution takia tapahtuvat mahdolliset geenimuunnokset eivät kasaudu ajan myötä.

Teasdale ja Kademi [23] osoittivat tutkimuksessaan, että mitä paremmin mikrobien kasvatuksessa käytetyt ravintoaineet on poistettu ennen lisäämistä puhdistusaineeseen, sitä vähemmän säilöntäaineita tarvitaan lopullisessa tuotteessa. Tuote on alttiina saastumiselle myös formulointitoimenpiteissä ja pakkaamisessa. Aineiden sekoittamiset tulee suorittaa laitteilla, jotka voidaan puhdistaa ja desinfioida täydellisesti. Laitteissa ei pidä olla staattisia kohtia, joissa neste ei pääse virtaamaan.

Pohjoismainen Joutsenmerkki määrittää kriteereissään, että mikrobeja sisältävistä puhdistusaineista tulee testata standardoiduilla menetelmillä patogeeneit *E. coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ja *Salmonella* [38]. Teasdalen ja Kademin mukaan patogeeneit tulee analysoida jokaisesta erästä siten, että näyte otetaan erän valmiiksi pakatusta tuotteesta [23]. Valmis tuote voi saastua, kun loppukäyttäjät valmistaa siitä laimennoksia. Tätä voitaisiin ehkäistä esimerkiksi annostelupumppujen avulla.

5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Kandidaatintyössä haettiin vastausta seuraaviin kysymyksiin: Mitä etuja ja haittoja mikrobeja sisältävillä puhdistusaineilla on perinteisiin puhdistusaineisiin verrattuna? Kuinka tehokkaita mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat rasvan ja öljyn poistamisessa koviilta pinnoilta? Mitä mikrobeja ja muita ainesosia markkinoilla olevat puhdistusaineet sisältävät? Minkälaisia riskejä terveydelle ja ympäristölle mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä mahdollisesti aiheutuu? Perusteltuja vastauksia varten etsittiin tieteellistä tietoa puhdistusmekanismeista, puhdistustehon testaamisesta, aineissa käytetyistä mikrobikannoista ja siitä onko aineiden käytössä ihmisiin tai ympäristöön kohdistuvaa turvallisuusriskiä.

Mikrobien puhdistusvaikutus perustuu teoriassa entsyymien ja biologisten pinta-aktiivisten aineiden erittämiseen ja niiden avulla hajotetun aineksen hyödyntämiseen mikrobien omassa aineenvaihdunnassa. Lopputuotteina rasvojen hajottamisessa lipaasien, β -oksidation ja sitruunahappokierron kautta syntyy vettä ja hiilidioksidia. Puhdistukseen liittyviä mekanismeja käytännön tilanteissa ei ole vielä tieteellisesti todistettu. Vertailukelpoisia puhdistustehotestien tuloksia mikrobeja sisältäville puhdistusaineille ei ole julkisesti saatavilla. Tämä saattaa johtua standardoimattomien ja yleisesti hyväksytyjen testausmenetelmien puutteesta. Mikrobikonsentraatiot puhdistusaineissa vaihtelevat julkisesti saatavilla olevan tiedon perusteella välillä 1×10^3 – 5×10^9 pmy/ml. Pohjoismaisen Joutsenmerkin mukaan mikrobeja tulee olla käyttöliuoksessa vähintään 1×10^5 pmy/ml, jotta ne vaikuttavat tuotteen tehoon. Tuotteessa todella olevien elinvoimaisten itiöiden lukumäärä on laatuhaaste, koska säilytysolosuhteet eivät aina ole ideaalit ja tuotteissa olevat muut ainesosat voivat vaikuttaa negatiivisesti itiöiden elinvoimaisuuteen.

Valmistajat pitävät yleensä puhdistusaineiden sisältämien mikrobien tarkkaa taksonomiaa liikesalaisuutena. Tämän kandidaatintyön tiedonhaun tuloksena löytyi kirjallisuusselvityksiä ja viljelymenetelmiin, testiliuskoihin sekä DNA:han perustuvia tunnistuksia, joiden avulla voitiin kertoa, mitä mikrobeja puhdistusaineisiin on lisätty. Valtaosa mikrobeja sisältävistä puhdistusaineista sisältää *Bacillus*-suvun bakteereja itiömuodossa. Seuraavaksi yleisimmät mikrobisuvut ovat: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Rhodopseudomonas* ja *Saccharomyces*. Näistä esimerkiksi *Bifidobacterium*-suvun jäsenet ovat obligaatisti anaerobisia, mikä asettaa kyseenalaiseksi niiden puhdistustehon kovien pintojen hapekkaissa olosuhteissa. Mikrobien lisäksi puhdistusaineet voivat sisältää ainakin pinta-aktiivisia aineita, entsyymejä, säilöntäaineita, hajusteita tai hankaavia aineita. Lisättyjen ainesosien vaikutus mikrobien elinvoimaisuuteen ja puhdistustehoon on syytä tutkia, koska se voi olla positiivinen tai negatiivinen.

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden vaikutuksesta ihmisen terveyteen on vain vähän tutkimustietoa, mutta tässä työssä viitattujen tutkimusten perusteella tuotteiden sisältämät bakteerit eivät yksinään näytä aiheuttavan allergiaa tai hengitysteiden herkistymistä eikä tuotteiden käyttö näytä lisäävän ilmassa olevien mikrobien määrää huolestuttavalla tavalla. Raportoituja sairasta-

pauksia, jotka olisivat liittyneet mikrobeja sisältäviin puhdistusaineisiin, ei tämän kirjallisuusselvityksen aikana löytynyt. Epävarmuutta riskien arviointiin aiheuttaa kuitenkin seuraavat tekijät: mikrobien taksonomia ei yleensä ilmoiteta tarkasti kantatasolle asti ja puhdistusaineet eivät ole vielä olleet kovin laajalti käytössä.

Mikrobien luotettava taksonominen tunnistaminen on lähtökohta riskien arvioinnille. Tarkan taksonomian tunnistamisen avulla voidaan varmistaa mikrobien vaarattomuus. Saman lajin eri kannoista yksi voi olla vaaraton ja toinen voi olla vaarallinen. Markkinoilla on valmiiksi hyväksytyillä menetelmillä tunnistettuja kantoja kantakokoelmista (esim. ATCC, DSMZ ja CBS-KNAW). Suomessa valtioneuvosto on määrännyt jakamaan biologiset tekijät niiden aiheuttaman vaaran perusteella neljään riskiryhmään. Samanlaista käytäntöä noudatetaan ainakin EU:ssa, Kanadassa ja Yhdysvalloissa. Puhdistusaineiden tulisi sisältää vain riskiryhmään 1 kuuluvia mikrobeja, jotka eivät todennäköisesti aiheuta sairautta ihmiselle eivätkä vaaranna työntekijän terveyttä.

Ympäristölle voi olla eduksi se, että mikrobeja sisältävät puhdistusaineet sisältävät useimmiten paljon vähemmän pinta-aktiivisia aineita ja ovat vähemmän emäksisiä kuin perinteiset vastaavaan käyttöön suunnitellut kemikaalit. Mikrobeja sisältävät puhdistusaineet eivät todennäköisesti vaikuta luonnon mikrobitasapainoon haitallisesti, mutta asiasta kaivataan lisää tutkimustietoa. Mietojen ainesosien takia mikrobeja sisältävät puhdistusaineet ovat perinteisiä kemikaaleja alttiimpia saastumiselle. Laadunvalvonta on tärkeää, jotta tuote sisältää vain terveydelle vaarattomia mikrobikantoja tehokkaassa konsentraatiossa. On suositeltavaa varmistaa jokaisen tuotteeseen lisätyn kannan biokemiallinen profiili, estää saastuminen formuloinnin ja pakkaamisen aikana, tutkia jokainen erä patogeenien varalta ja suunnitella loppukäyttäjälle helppo ja hygieeninen anostelumenetelmä.

Ravintolan lattiaa puhdistettaessa toimitaan alueilla, joilla käsitellään ruokaa. Puhdistukseen käytettävien tuotteiden ja menetelmien laadunvalvonnan avulla on siis varmistettava, että ruokaan ei joutu ihmiselle haitallisia aineita. Tässä työssä viitatus tutkimukset antavat perusteita hypoteesille, että lattian puhdistamisen takia huoneilmaan ja sitä kautta ruokaan joutuu vain vähän mikrobeja. Hypoteesi tulisi kuitenkin testata ravintolaympäristössä, koska tässä työssä viitatussa tutkimuksessa tutkittiin kokolattiamaton puhdistusprosessia, jossa matto on saattanut sitoa itiöitä ja bakteereja kovasta lattiapinnasta poikkeavalla tavalla.

Tämän kirjallisuusselvityksen perusteella mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden käytöstä ravintolan lattian puhdistamisessa on ainakin teoriassa monia etuja perinteisiin kemikaaleihin nähden. Teoriassa mikrobien avulla saadaan perinteisiä kemikaaleja pitempi vaikutusaika ja haitattomammat lopputuotteet: vesi ja hiilidioksidi. Vaikuttaa siltä, että mikrobien avulla voidaan pienentää terveydelle haitallisten ja ympäristöön joutuvien kemikaalien määrää. Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden toimivuudesta käytännön tilanteissa on saatavilla varsin niukasti tutkimustietoa, joten on toteutettava itse muun muassa puhdistustehotestejä ja tutkittava bioaerosolien muodostumista ravintolan lattian puhdistuksen yhteydessä.

6. JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET

Mikrobeja sisältävien puhdistusaineiden puhdistustehosta ei ole saatavilla vertailukelpoista tietoa. Ei siis pystytä määrittämään kuinka paljon lisätyt mikrobikannat vaikuttavat puhdistusaineen tehoon. Tämän kandidaatintyön luvussa 2.4.2 on esitetty ehdotus, kuinka puhdistustehoa voitaisiin tutkia soveltamalla Tuula Suontamon väitöskirjassaan kehittämää menetelmää. Puhdistustehoa tutkimalla voitaisiin perustella kannattaako mikrobeja lisätä puhdistusaineisiin. Tutkitusti todistettu puhdistusteho olisi myös selkeä kilpailuetu.

Kiinnostava tutkimuksen aihe olisi ilmassa olevien mikrobien lukumäärä, kun ravintolan kovaa lattiapintaa pestään mikrobeja sisältävällä puhdistusaineella. Tutkimuksessa voitaisiin soveltaa Bergin et al. [60] menetelmiä, joilla he tutkivat kokolattiamaton puhdistamisesta syntyviä bioaerosoleja. Tutkimuksen avulla voitaisiin paremmin arvioida ruokaan mahdollisesti päätyvien mikrobien lukumäärää. Tässä luvussa mainittujen kahden tutkimuksen avulla voitaisiin perustella jonkun mikrobeja sisältävän puhdistusaineen puhdistusteho ja turvallisuus, mitkä todennäköisesti ovat ensimmäisten asioiden joukossa, mistä asiakkaat haluavat tietoa.

LÄHTEET

- [1] T. Suontamo, Siivouskemian haasteet puhtauspalveluissa, LUMAT, Vol. 3, No. 7, 2015, s. 1026–1032.
- [2] G. Arvanitakis, R. Temmerman, A. Spök, Development and use of microbial-based cleaning products (MBCPs): Current issues and knowledge gaps, Food and Chemical Toxicology, Vol. 116, 2018, pp. 3–9.
- [3] A. Spök, G. Arvanitakis, G. McClung, Status of microbial based cleaning products in statutory regulations and ecolabelling in Europe, the USA, and Canada, Food and Chemical Toxicology, Vol. 116, 2018, pp. 10–19.
- [4] G.A. Al-Ghalith, D. Knights, Focus: Personalized Medicine: Bygiene: The New Paradigm of Bidirectional Hygiene, The Yale Journal of Biology and Medicine, Vol. 88, Iss. 4, 2015, pp. 359.
- [5] F. Al-Marzooq, S.A. Bayat, F. Sayyar, H. Ishaq, H. Nasralla, R. Koutaich, S.A. Kawas, Can probiotic cleaning solutions replace chemical disinfectants in dental clinics? European Journal of Dentistry, Vol. 12, Iss. 4, 2018, pp. 532.
- [6] E. Caselli, Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings, Microbial Biotechnology, Vol. 10, Iss. 5, 2017, pp. 1079–1083.
- [7] E. Caselli, L. Arnoldo, C. Rognoni, M. D'Accolti, I. Soffritti, L. Lanzoni, M. Bisi, A. Volta, R. Tarricone, S. Brusaferrero, S. Mazzacane, Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: a multicenter study, Infection and Drug Resistance, Vol. 12, 2019, pp. 501–510.
- [8] E. Caselli, M.D. Accolti, A. Vandini, L. Lanzoni, M.T. Camerada, M. Coccagna, A. Branchini, P. Antonioli, P.G. Balboni, D.D. Luca, S. Mazzacane, Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation, PLoS One, Vol. 11, Iss. 2, 2016.
- [9] E. Caselli, B. Silvio, M. Coccagna, L. Arnoldo, F. Berloco, P. Antonioli, R. Tarricone, G. Pelissero, S. Nola, V. La Fauci, A. Conte, L. Tognon, G. Villone, N. Trua, S. Mazzacane, for the SAN-ICA, Study Group, Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study, PLoS One, Vol. 13, Iss. 7, 2018.
- [10] M. D'Accolti, I. Soffritti, M. Piffanelli, M. Bisi, S. Mazzacane, E. Caselli, Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential as sanitizing agents, Infection and Drug Resistance, Vol. 11, 2018, pp. 1015–1026.
- [11] A. Dural-Erem, P. Wessman, U. Husmark, V. Nierstrasz, Biocontrol of solid surfaces in hospitals using microbial-based wipes, Textile Research Journal, Vol. 89, Iss. 2, 2019, pp. 216–222.
- [12] M. D'Accolti, I. Soffritti, S. Mazzacane, E. Caselli, Fighting AMR in the Healthcare Environment: Microbiome-Based Sanitation Approaches and Monitoring Tools, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 20, Iss. 7, 2019.
- [13] A. Vandini, R. Temmerman, A. Frabetti, E. Caselli, P. Antonioli, P.G. Balboni, D. Platano, A. Branchini, S. Mazzacane, Hard Surface Biocontrol in Hospitals Using Microbial-Based Cleaning Products, PLoS One, Vol. 9, Iss. 9, 2014.

- [14] S. Damodaran, K.L. Parkin, Fennema's Food Chemistry, 5th ed. CRC Press, London, 2017.
- [15] Työskentelylämpötilat, Palvelualojen Ammattiliitto PAM, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.pam.fi/wiki/tyoskentelylampotilat.html>.
- [16] M. Aulanko, Pesu- ja puhdistusaineet, 3. uusittu painos, Suomen Siivoustekninen liitto ry, Helsinki, 2010, 141 s.
- [17] Puhtausalan sanasto, Suomen Standardoimisliitto, SFS 5967, Helsinki, 2010, 77 s.
- [18] D.J. Hart, C.M. Hadad, L.E. Craine, H. Hart, Organic Chemistry, 13th Edition, International edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2011, 305 p.
- [19] X. He, M. So, de los Reyes III, Francis, Shifts in microbial communities in bioaugmented grease interceptors removing fat, oil, and grease (FOG), Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 100, Iss. 16, 2016, pp. 7025–7035.
- [20] S. Jussila, Biopuhdistus verrattuna perinteiseen puhdistukseen saniteetti- ja muissa kohteissa tiloissa, Pro Gradu, Soveltavan kemian osasto, Jyväskylän yliopisto, Jyväskylä, 2003, 74 s.
- [21] T. Suontamo, Development of a test method for evaluating the cleaning efficiency of hard-surface cleaning agents, Department of chemistry, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland, 2004, 84 p.
- [22] M.T. Madigan, K.S. Bender, D.H. Buckley, W.M. Sattley, D.A. Stahl, Brock Biology of Microorganisms, 15th Global edition, Pearson, 2018, 1064 p.
- [23] S.M. Teasdale, A. Kademi, Quality challenges associated with microbial-based cleaning products from the Industry Perspective, Food and Chemical Toxicology, Vol. 116, 2018, pp. 20–24.
- [24] C. Villeneuve, G. Marchand, M. Gardette, J. Lavoie, E. Neesham-Grenon, D. Bégin, M. Debia, Assessment of workers' exposure to microorganisms when using biological degreasing stations, Food and Chemical Toxicology, Vol. 116, 2018, pp. 53–59.
- [25] DD484 Orgaaninen Hiilivetyypohjaisten aineiden puhdistaja 10 L, tuotetiedot, Eco Eco Solutions Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://ekoekoshop.fi/products/dd484-orgaaninen-hiilivetyypohjaisten-aineiden-puhdistaja>.
- [26] Drain Clean, tuotetiedot, Kiilto Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.kiilto.fi/fi/tuotteet/kiilto-drain-clean>.
- [27] Odor Stop, tuotetiedot, Kiilto Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.kiilto.fi/fi/tuotteet/kiilto-odor-stop>.
- [28] Biorine, tuotetiedot, Kiilto Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.kiilto.fi/fi/tuotteet/kiilto-biorine/>.
- [29] Usein kysyttyä, Protect Pipe Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.protectpipe.fi/faq-2/>.
- [30] TEHO BioFloor Mop, tuotetiedot, Hitech Chemicals Finland Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <http://www.hitech.fi/hitech/?wpsc-product=teho-biofloor-mop>.
- [31] Probisolution, Dimacon Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://probisolution.fi/>.

- [32] BioSwipe, tuotetiedot, HomCare Finland Oy, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.homcare.fi/kodinhoito/bioswipe/>.
- [33] D. Dianawati, V. Mishra, N.P. Shah, Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review, *Critical reviews in food science and nutrition*, Vol. 56, Iss. 13, 2016, pp. 2250.
- [34] E.H. Madslie, N. Asare, Ø Bergh, E. Joner, P. Trosvik, S. Yazdankhah, O.M. Eklo, K.M. Nielsen, B. Ytrehus, Y. Wasteson, Current knowledge of the health and environmental risks of microbial-based cleaning products. Scientific opinion of the Panel on Microbial Ecology of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment. VKM report 2019:09, Norwegian Scientific Committee for Food and Environment (VKM), Oslo, Norway, 2019.
- [35] Á.T. Kovács, *Bacillus subtilis*, *Trends in Microbiology*, Vol. 27, Iss. 8, 2019, pp. 724–725.
- [36] M.K. Campbell, S.O. Farrell, *Biochemistry*, 8th ed. STM, 2014, 864 p.
- [37] A.F. Tayabali, Y. Zhang, J.H. Fine, D. Caldwell, M. Navarro, Acellular filtrate of a microbial-based cleaning product potentiates house dust mite allergic lung inflammation, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 116, 2018, pp. 32–41.
- [38] Joutsenmerkin kriteerit: Puhdistusaineet, Ympäristömerkintä Suomi Oy, 2018, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://joutsenmerkki.fi/kriteerit/puhdistusaineet-6/>.
- [39] Valtioneuvoston asetus työntekijöiden suojelemiseksi biologisista tekijöistä aiheutuilta vaaroilta, 933/2017, 2017, Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2017/20170933>.
- [40] Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus biologisten tekijöiden luokituksesta 921/2010, 2010, Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2010/20100921>.
- [41] ePATHogen - Risk Group Database, Health Canada, Government of Canada, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://health.canada.ca/en/epathogen>.
- [42] Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 9: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2018, European Food Safety Authority, 2019, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5555>.
- [43] R.M. Subasinghe, A.D. Samarajeewa, M. Meier, G. Coleman, H. Clouthier, J. Crowthwait, A.F. Tayabali, R. Scroggins, P.S. Shwed, L.A. Beaudette, Bacterial and fungal composition profiling of microbial based cleaning products, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 116, 2018, pp. 25–31.
- [44] Learn how to live sustainably using EM microbial technology on agriculture and environment, EM Research Organization, 2016, verkkosivu, Saatavissa (viitattu 19.8.2019): <https://www.emrojapan.com/what/>.
- [45] G.S. Averyn, M.P. Vernon, W.M. Crockett, L.D. McLean, Cleaning fluid comprising glycerin and a culture of microorganisms, Pat. US 8,951,953 B2, Hak. nro PCT/GB2012/052866, 2015.
- [46] S. Bernatchez, V. Anoop, Z. Saikali, M. Breton, A microbial identification framework for risk assessment, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 116, 2018, pp. 60–65.
- [47] K. Kawasaki, H. Kondo, M. Suzuki, S. Ohgiya, S. Tsuda, Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution, *Acta Crystallogr. Sect.D*, Vol. 58, 2002, pp. 1168–1174.

- [48] D.B. Kearns, R. Losick, Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*, *Genes & development*, Vol. 19, Iss. 24, 2005, pp. 3083–3094.
- [49] I. Benoit, M.H. van den Esker, A. Patyshakuliyeva, D.J. Mattern, F. Blei, M. Zhou, J. Dijksterhuis, A.A. Brakhage, O.P. Kuipers, R.P. de Vries, A.T. Kovács, *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism, *Environmental Microbiology*, Vol. 17, Iss. 6, 2015, pp. 2099–2113.
- [50] S. Fujinami, M. Fujisawa, Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future, *Environmental Technology*, Vol. 31, Iss. 8–9, 2010, pp. 845–856.
- [51] F.N. Niyonzima, S. More, Biochemical properties of the alkaline lipase of *Bacillus flexus* XJU-1 and its detergent compatibility, *Biologia*, Vol. 69, Iss. 9, 2014, pp. 1108–1117.
- [52] M. Tzirita, S. Papanikolaou, B. Quilty, Degradation of Fat by a Bioaugmentation Product Comprising of *Bacillus* spp. Before and After the Addition of a *Pseudomonas* sp, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 120, Iss. 2, 2018.
- [53] D. Jones, Cleaning solution to remove hydrocarbons from a substrate, Pt. WO/2002/033031, Hak. nro PCT/IB2001/001925, 2002.
- [54] K.J. Molinaro, D.E. Pedersen, J.P. Magnuson, M.E. Besse, J.J. Steep, V.F. Man, Stable antimicrobial compositions including spore, bacteria, fungi and/or enzyme, Pt. US 20110207649, 2011.
- [55] R.O. Richardson, A.F. Bromirski, L.T. Davis, Liquid cleaner containing viable microorganisms, Pt. EP 0 245 560, Hak. nro 86309599.8, 1990.
- [56] N.A. Logan, *Bacillus* and relatives in foodborne illness, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 112, Iss. 3, 2012, pp. 417–429.
- [57] R. Mikkola, M. Kolari, M.A. Andersson, J. Helin, M.S. Salkinoja-Salonen, Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*, *European journal of biochemistry*, Vol. 267, Iss. 13, 2000, pp. 4068–4074.
- [58] M. Gueimonde, B. Sánchez, C. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles, Antibiotic resistance in probiotic bacteria, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4, 2013, pp. 202.
- [59] J. Jeżewska-Fraćkowiak, K. Seroczyńska, J. Banaszczyk, G. Jedrzejczak, A. Żylicz-Stachula, P.M. Skowron, The promises and risks of probiotic *Bacillus* species, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 65, Iss. 4, 2018, pp. 509.
- [60] N.W. Berg, M.R. Evans, J. Sedivy, R. Testman, K. Acedo, D. Paone, D. Long, T.G. Osimitz, Safety assessment of the use of *Bacillus*-based cleaning products, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 116, 2018, pp. 42–52.
- [61] A. Cesare, E. Caselli, A. Lucchi, C. Sala, A. Parisi, G. Manfreda, S. Mazzacane, Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota, *Poultry science*, 2019.
- [62] F. Dannen, F.J. Gaikema, J.M. Nab-Vonk, *Bacteriële reinigers, Reinigers op basis van micro-organismen met eventuele toevoegingen*, Groningen, Netherlands, 2004, 76 p.