

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 30 1990

Omsætning af faste
materialer i miljøet

Miljøministeriet **Miljøstyrelsen**

Strandgade 29, 1401 København K, tlf. 31 57 83 10

628.4.043 : 349.6

E-2

2x.3

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, nr. 30/1990

Omsætning af faste materialer i miljøet

Axel Damborg og Preben Kristensen
Vandkvalitetsinstituttet

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
Strandgade 29
1401 København K

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

INDHOLDSFORTEGNELSE

1.	INDLEDNING	5
2.	PROBLEMFORMULERING	5
3.	TESTMETODER	7
3.1	Mikrobielle metoder	7
3.1.1	Måling af vægttab	7
3.1.2	Andre fysiske måleprincipper	10
3.1.3	Måling af bakterie- og svampevækst .	11
3.1.4	Måling af kuldioxiddannelse og iltforbrug	13
3.1.5	Måling ved specifikke metoder	15
3.2	Abiotiske metoder	16
3.3	Vurdering af anvendelighed	17
4.	FORSLAG TIL TESTSTRATEGI OG -METODER . . .	20
4.1	Teststrategi	20
4.2	Undersøgelse af holdbarhed (primær nedbrydelighed)	22
4.2.1	Undersøgelse af abiotisk forvitring .	22
4.2.2	Undersøgelse af primær bionedbrydelighed	23
4.3	Undersøgelse af omdannelse (ultimativ nedbrydelighed)	23
4.3.1	Forbehandling	24
4.3.2	Undersøgelse af ultimativ bionedbrydelighed	24
5.	KONKLUSION	27
6.	REFERENCER	29

1. INDLEDNING

Nærværende projekt "Omsætning af faste materialer i miljøet" er et konto 12 projekt udført af Vandkvalitetsinstituttet, ATV for Miljøstyrelsens kemisk-toksikologiske kontor. Formålet med projektet har været at gennemgå tilgængelig litteratur om metoder til undersøgelse af faste materials biologiske nedbrydelighed med henblik på at opstille forslag til testmetoder. Omfanget af det udførte litteraturstudium har været begrænset til plast- og papirmaterialer, men den gennemgaaede litteratur har overvejende omhandlet plastmaterialer. Den opstillede strategi og de foreslåede testmetoder vurderes dog også at kunne anvendes for andre faste materialer end plastic.

Projektet har været fulgt af en styringsgruppe bestående af:

- John Holten Andersen, Miljøstyrelsens kemisk-toksikologiske kontor (formand, udtrådt 1/4 1990),
- Ole K. Jensen, Miljøstyrelsens kemisk-toksikologiske kontor,
- Finn Pedersen, Miljøstyrelsens kemisk-toksikologiske kontor,
- Axel Damborg, Vandkvalitetsinstituttet, ATV,
- Preben Kristensen, Vandkvalitetsinstituttet, ATV.
- Peter Gammeltoft, Miljøstyrelsens kemisk-toksikologiske kontor (indtrådt 1/4 1990).

2. PROBLEMFORMULERING

Plastmaterialer består udover selve plastpolymeren af en lang række stoffer, der enten skal give materialet en bestemt egenskab og udseende eller skal sikre at materialets egenskaber bevares. Det drejer sig specielt om blødgørere, emulgatorer, farver og stabilisatorer. Derudover kan plastmaterialer indeholde fyldstoffer.

Papirmaterialer vil bestå af træfibre, der indeholder lignin og cellulose. Derudover tilsættes i papirproduktionen blegemidler (f.eks. i form af hypochlorit eller brintperoxid), emulgatorer, fyldstoffer, farver og coatingmidler.

Et fast materiale som f.eks. plastic eller papir indeholder således en lang række andre stoffer end blot polymermaterialet, der danner basis for selve materialet. En nedbrydning af materialet vil derfor indebære nedbrydning af alle de enkeltstoffer, som materialet indeholder samt en mulig frigørelse af disse fra materialet til omgivelserne.

Ved vurdering af sammensatte materials nedbrydelighed er det derfor vigtigt at skelne mellem:

- forvitring af materialet til de enkeltstoffer, som materialet består af,
- primær nedbrydning af enkeltstofferne til stabile metabolitter,
- ultimativ nedbrydning af enkeltstofferne til kuldioxid og vand.

Det første trin i en nedbrydning af et materiale kan være en frigørelse af enkeltstoffer i materialet fra materialets matrix i form af udvaskning eller fordampning. Denne proces kan forløbe fuldstændigt, således at materialet forvitres fuldstændigt, og alle enkeltstofferne frigøres. Dette er ikke et udtryk for en ultimativ nedbrydning af materialets enkeltstoffer.

Processen kan dog også standse, inden alle enkeltstoffer er frigjorte (gjort vandopløselige/fordampelige). Herved kan materialets fysiske egenskaber ændres, og i sin yderste konsekvens kan materialet findeles til små partikler, stadig uden at der er tale om en ultimativ nedbrydning af materialets enkeltstoffer.

De frigjorte enkeltstoffer kan være biologisk nedbrydelige i vandfasen i det miljø, som de frigives til, men en måling af materialets forvitring vil ikke kunne afgøre om de frigivne stoffer er nedbrydelige.

I det følgende gennemgås de testmetoder for faste materials nedbrydning, som er refereret i litteraturen.

3. TESTMETODER

3.1 Mikrobielle metoder

3.1.1 Måling af vægttab

Undersøgelser af plastpolymerers nedbrydelighed har været udført med podning af renkulturer af bakterier og svampe eller blandede podematerialer i form af jord eller aktivt slam eller med tilsætning af opløsninger af oprensede enzymer.

Bakteriekulturer

Kumar et al /33, 34/ har undersøgt forskellige gelatinebaserede copolymerers omsætning i form af egnethed som substrat for en række renkulturer af bakterier (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Serratia marcescens*). Forsøgene blev udført i et syntetisk medium bestående af:

0,7	g KH_2PO_4
0,7	g K_2HPO_4
0,7	g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,0	g NH_4NO_3
0,005	g NaCl
0,002	g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,002	g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,001	g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15,0	g agar

opløst i 1000 ml destilleret vand.

Undersøgelser af copolymerernes anvendelighed som kvælstofkilder for bakterier blev udført med samme medium uden tilsætning af ammoniumnitrat.

Copolymererne blev testet i form af filmplader med en tykkelse på 2 mm. Nedbrydningen blev målt som vægttab af filmpladerne efter vask og tørring. Undersøgelserne forløb over 6 uger ved en temperatur på 20°C.

Resultaterne viste, at gelatine-copolymerer baseret på polyacrylonitril var mindre nedbrydelige end copolymerer baseret på polymethylacrylat. Forsøg uden tilsætning af andre kulstof- og kvælstofkilder end copolymererne til testmediet viste en lille men signifikant forøgelse af nedbrydningen. Kvælstofanalyser viste endvidere, at bakterierne anvendte polymererne som kvælstofkilde.

Undersøgelser af et materiales egnethed som substrat for mikroorganismers vækst kan anvendes som mål for materialets holdbarhed. Metoden kan ikke anvendes ved vurdering af et materiales nedbrydelighed, idet enkeltstoffer i et komplekst sammensat materiale ikke nødvendigvis nedbrydes, selv om materialet kan fungere som substrat.

Anvendelsen af renkulturer af bakterier i testen gør, at mange forskellige renkulturer skal medtages for at sikre, at et testresultat, der viser, at materialet er holdbart, vil være gyldigt i de forskelligartede miljøer, som materialet kan forekomme i. Alternativt kan anvendes blandkulturer eller podemateriale fra forskellige miljøer (aktivt slam og jord).

Anvendelsen af vægttab som parameter for materialets nedbrydning (og dermed egnethed som substrat) er en usikker metode, da vedhæftning af partikler mm. selv efter vask og tørring kan skjule et mindre vægttab.

Enzymsystemer

Ratner et al /47/ har undersøgt nedbrydningen af polyurethaner ved hjælp af exo- og endopeptidaser. Som exopeptidase blev anvendt leucin-amino-peptidase og som endopeptidaser blev anvendt papain og α -chymotrypsin. Forsøgene blev udført i buffermedier med pH-værdier svarende til enzymernes optimale pH.

Papain-bufferen (pH 6,8) bestod af:

0,1	M N'-2-hydroxy-ethyl-piperazin-N'-ethansulfonsyre (HEPES)
0,2	% NaN_3
0,0055	M cystein
0,01	M EDTA
0,06	M mercaptoethanol

α -Chymotrypsin-bufferen (pH 7,8) bestod af:

0,1	M N'-2-hydroxy-ethyl-piperazin-N'-ethansulfonsyre (HEPES)
0,2	% NaN_3

Leucinaminopeptidase-bufferen (pH 8,5) bestod af:

0,1	M N'-2-hydroxy-ethyl-piperazin-N'-ethansulfonsyre (HEPES)
0,2	% NaN_3
0,025	M MnCl_2

Desuden blev den oxidative nedbrydning af polymererne undersøgt ved eksponering med en 3% opløsning af brintperoxid.

Polymererne blev påført i en mængde svarende til $12,0 \pm 0,5$ mg som film på plader med en diameter på 12 mm bestående af glas, sølv, guld eller kobber. Filmpladerne blev påført buffermedierne tilsat de respektive enzymer eller brintperoxid og inkuberet ved 37°C i op til en uge. Nedbrydningen blev målt som vægttab. Målingerne blev suppleret med analyser af molekylvægts-fordelingen ved hjælp af gel-permeation-chromatografi (GPC).

Vægttabet efter 24 timer var for alle testede polymerer mindre end 8,5%. Efter 7 dage var vægttabet mindre end 5,3%. Faldet i vægttabet ved længere tids eksponering kan skyldes, at prøverne optager adsorberet enzym eller adsorberede salte og derved forøger prøvernes vægt. Undersøgelserne af enzymernes effekt på molekylvægtsfordelingen efter 7 dage viste kun i få tilfælde en lille, signifikant ændring af fordelingen.

Anvendelse af oprensede enzymsystemer er uegnet ved en generel testning af både holdbarhed og omsættelighed. Der vil ved en sådan testning kræves et stort antal tests med forskellige enzymsystemer for at dække det størst mulige spektrum af enzymatiske påvirkninger i miljøet.

Anvendelse af analyser for molekylvægts-fordeling kan være et vigtigt supplement til undersøgelse af vægttab. Ændringer i molekylvægts-fordelingen i specielt polymere materialer er et udtryk for en begyndende nedbrydning af strukturen i materialet, som ikke nødvendigvis kommer til udtryk i et umiddelbart vægttab.

Jord/aktivt slam

Kumar et al /34/ har undersøgt nedbrydningen af copolymerer baseret på gelatine i jord. Jorden var en blanding af muldjord, tørvejord og sand. Polymerfilmene (tykkelse 1 mm) blev placeret i potter med jord og inkuberet i op til 6 uger ved en dagtemperatur på 28-30°C og en nattemperatur på 20-22°C. Nedbrydningen blev målt som vægttab efter vask og tørring af polymerfilmene.

Der blev registreret et vægttab af polymerfilmene på op til 10% af den oprindelige vægt.

Doi et al /14, 15/ har undersøgt nedbrydningen af polymerer bestående af hydroxybutyrat og hydroxyvalerat. Disse polymerer blev produceret mikrobielt af *Alcaligenes eutrophus*. Nedbrydningsforsøgene blev udført med 0,07 mm tykke skiver af polymererne med en diameter på 8 cm. Pladerne blev inkuberet i jord ved 20-25°C henholdsvis i aktivt slam ved 30°C i op til 6 uger. Nedbrydningen blev målt som vægttab.

Resultaterne viste, at en copolymer indeholdende 91% 3-hydroxybutyrat og 9% 4-hydroxybutyrat blev nedbrudt hurtigere i jord end en polymer bestående udelukkende af 3-hydroxybutyrat. Indbygning af 50% 3-hydroxyvalerat i copolymeren havde ingen effekt på nedbrydningen. Det synes altså, at den ufor-gre-nede struktur af 4-hydroxybutyrat øger nedbrydeligheden.

Resultaterne fra nedbrydningsforsøgene i aktivt slam viste en fuldstændig nedbrydning af copolymeren indeholdende 9% 4-hydroxybutyrat i løbet af

2 uger. De øvrige polymerer blev nedbrudt langsomere.

Anvendelse af vægttab som måleparameter i forbindelse med inkubering i jord/aktivt slam kan kun give et udtryk for komplekse materials holdbarhed. Mindre komponenter i et komplekst materiale vil ved nedbrydning eller udvaskning fra materialet kun give anledning til et relativt lille vægttab. Anvendelse af vægttab som mål for holdbarhed vil i sådanne tilfælde kræve et supplement af andre metoder, der kan detektere ændringer i materialets sammensætning eller registrere udvaskede komponenter.

3.1.2 Andre fysiske måleprincipper

Deshmukh & Singh /10, 11/ har undersøgt nedbrydningen af copolymerer bestående af harpikser (xanthan- og guar-gummi) og polyacrylamid. En 0,1% opløsning i destilleret vand af copolymeren blev inkuberet ved 30°C i 10 dage. Arten og mængden af det anvendte podemateriale er ikke angivet i referencerne. Nedbrydningen af copolymererne blev målt som ændring i opløsningens viskositet.

For copolymerer baseret på guar gummi sås ingen ændring af viskositeten inden for testperioden på 10 dage, mens copolymerer baseret på xanthangummi blev nedbrudt. En øget indbygning af acrylamid i copolymererne øgede polymerernes resistens mod nedbrydning.

Soria et al /51/ har undersøgt nedbrydningen af copolymerer mellem methyl-methacrylat og methyl-isopropenyl-ke-ton under miljømæssige forhold. Polymermaterialerne blev anvendt som film med en tykkelse på $0,23 \pm 0,02$ mm. Plaststykkerne blev udlagt i sollys på jordoverfladen eller dækket med 9 cm jord. Fotonebrydningen af materialet blev målt som nedsættelse af trækstyrken.

Nedbrydningen af copolymererne viste en stærk afhængighed af intensiteten af sollys og eksponeringstid. De prøver, som var dækket med jord, blev ikke nedbrudt signifikant, mens de prøver, som var placeret i det mest intense sollys, blev mest nedbrudte. En øget indbygning af methyl-isopropenyl-ke-ton nedsatte polymerernes holdbarhed væsentligt.

Chu /8/ har undersøgt den hydrolytiske nedbrydning af to polymermaterialer (polyglycolsyre og poly(glycolid-lactid)). Polymermaterialerne, formet som tråde, blev nedsænket i buffermedier ved tre forskellige pH-værdier (5,25; 7,44 og 10,09). Nedbrydningen blev målt som nedsættelse af polymertrådenes trækstyrke. For den ene polymertype var nedbrydningen mindst i surt miljø,

mens den for den anden var mindst i neutralt miljø.

De her beskrevne måleprincipper for undersøgelse af polymerers nedbrydning kan kun anvendes ved afprøvning af materialers holdbarhed og ikke ved undersøgelse af omsættelighed. Anvendeligheden af de beskrevne måleprincipper vil i hvert enkelt tilfælde afhænge af de testede materialers fysiske egenskaber.

3.1.3 Måling af bakterie- og svampevækst

ASTM (American Society for Testing and Materials) har udarbejdet standarder for undersøgelse af polymermaterialers modstandskraft mod angreb af svampe /3/ og bakterier /4/. Polymermaterialerne undersøges i form af kvadratiske skiver (50·50 mm), cirkulære plader (diameter 50 mm) eller rektangulære stænger (> 76 mm lange) subsidiært film placeret på glasplader (50·25 mm) for polymerer, som anvendes til f.eks. plastfilm.

Ved undersøgelse af svampeangreb placeres testmaterialet på et agarmedium bestående af:

0,7	g KH_2PO_4
0,7	g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,0	g NH_4NO_3
0,005	g NaCl
0,002	g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,002	g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,001	g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15,0	g agar

opløst i 1000 ml destilleret vand og reguleret til pH mellem 6,0 og 6,5.

Materialet dækkes med sporer fra renkulturer af en af følgende svampetyper: *Aspergillus niger*, *Penicillium funicolosum*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* og *Aureobasidium pullulans*. Testmaterialet inkuberes ved 28-30°C og en luftfugtighed på mere end 85% i mere end 21 dage. Svampeangrebene vurderes visuelt og klassificeres efter svampevækstens udbredelse:

- Klasse 0: ingen vækst
- Klasse 1: spor af vækst (< 10% dækket)
- Klasse 2: let vækst (10-30% dækket)
- Klasse 3: middel vækst (30-60% dækket)
- Klasse 4: stærk vækst (> 60% dækket)

Ved undersøgelse af bakterieangreb placeres testmaterialet på et agarmedium bestående af:

0,7	g KH_2PO_4
0,7	g K_2HPO_4
0,7	g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,0	g NH_4NO_3
0,005	g NaCl
0,002	g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,002	g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,001	g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
15,0	g agar

opløst i 1000 ml destilleret vand.

Den smeltede agar podes med en renkultur af bakterier (*Pseudomonas aeruginosa*) svarende til 50.000 kim/ml ved dybdeudsæd i petriskåle (tykkelse: 6-12 mm). Testmaterialet placeres på agarens overflade og inkuberes ved 35-37°C og en luftfugtighed på mere end 85% i mere end 21 dage. Bakterieangrebene vurderes visuelt som vækst eller ikke-vækst.

DiBenedetto et al /12/ har undersøgt nedbrydningen af hydroxylerede polymerer indeholdende enten zink eller tin ved anvendelse af ASTMs metode for svampeangreb. Ved forsøgene blev anvendt *Aspergillus niger*. Tilstedeværelse af zink indbygget i polymermaterialet betød, at der ikke kunne ses svampevækst, mens et indhold af tin ikke hindrede svampevækst.

Den frigivne zink fældede ud i agaren (formentlig som zink-fosfat). Dette fænomen blev anvendt til at undersøge hastigheden, hvormed zink diffunderede ud af en tablet bestående af polymermaterialet. Tilsvarende kunne diffusionen af zink spores som et cirkulært opklaret område omkring tabletten uden svampevækst.

Cooney & Wiles /9/ har undersøgt væksten af 6 forskellige svampetyper (*Aspergillus niger*, *Penicillium funicolosum*, *Paecilomyces varioti*, *Trichoderma virgatum*, *Chaetomium globosum* og *Penicillium janthinellum*) på polymere materialer, der havde været bestrålet med UV-lys. Bestrålingen viste ingen effekt på nedbrydeligheden af de undersøgte polymerer, men det kan ikke udelukkes at bestrålingen i andre situationer kan have en effekt, idet de undersøgte polymerer alle var resistente for svampeangreb.

Stranger-Johannessen /53/ har undersøgt vækst af renkulturer af svampe, bakterier og actionomyceter på polyethylen. Som testmateriale blev anvendt polyethylen både med og uden tilsætning af organisk stof. Plastmaterialer, som havde været bestrålet med UV-lys eller udsat for vind og vejr i 17 måneder, blev anvendt sammen med det oprindelige plastmateriale. Plastmaterialet blev anvendt i rektangulære strimler med en størrelse på 5·50 mm, som blev desinficeret med ethanol og tørret. Plaststrimlerne blev enten dyppet i ren-

kulturerne og lagt på overfladen af mineralagar i petriskåle eller nedsænket i et mineralmedium tilsat 0,5 ml renkultur. Forsøgene blev inkuberet ved 28°C i op til et år; ved indtørring af agarpladerne blev strimlerne overført til friske agarplader. Mikroorganismernes vækst på plaststrimlerne blev undersøgt og suppleret med målinger af plaststrimlernes vægttab.

Undersøgelserne viste vækst af mikroorganismer på plaststrimlerne. Væksten var større på de typer, som indeholdt ekstra organisk stof. Desuden sås en forøget vækst som følge af forøget bestrålingstid. Vægttabet efter 1 års nedbrydning var dog lille, men mere signifikant med en forøget bestrålingstid; specielt de plasttyper, som havde været bestrålet mere end 900 timer viste et kraftigt vægttab. De plasttyper, som havde været udsat for vind og vejr inden nedbrydningen, viste kun et ringe vægttab som følge af nedbrydningen, mens den ubehandlede plasttype, som indeholdt ekstra organisk stof, viste et markant vægttab i løbet af den første måned af vækststudiet, hvorefter der ikke skete yderligere vægttab. Konklusionen var, at det ekstra organiske stof var blevet nedbrudt under forbehandlingen, men ikke gav anledning til øget nedbrydning af selve polymeren.

Vækst af bakterier eller svampe på overfladen af polymerer er et udtryk for et materiales egnethed som substrat for bakterier og svampe og dermed et mål for materialets holdbarhed. En undersøgelse af omsætteligheden af et materiale vil derimod kræve supplerende parametre, der kan belyse materialets fuldstændige nedbrydning og skæbnen af de stoffer, som kan udvaskes fra materialet under processen.

3.1.4 Måling af kuldioxiddannelse og iltforbrug

Jones et al /26/ har undersøgt polyethylen, polypropylen og polystyren i jord og aktivt slam. Plastmaterialerne blev bestrålet med UV-lys indtil materialet blev skørt og kunne brækkes mellem fingrene. Herefter blev materialet findelt. Bestrålingen med UV-lys blev anvendt, idet materialer, der undergår en mekanisk forandring (f.eks. efter bestråling) kan have en større tilgængelighed for mikrobiel nedbrydning.

Jord-testene blev udført i respirometre, hvor det findelte plastmateriale blev opblandet med jord. Respirometrene indeholdt desuden et bæger med kaliumhydroxid for absorption af dannet kuldioxid. Respirometrene blev forseglet, og inkuberet ved 5°C og et vandindhold på 60% af jordens maksimale vandindhold. Vandindholdet blev reguleret hver uge, samtidig med at opløsningerne med kaliumhydroxid blev udskiftet. Nedbrydningen blev målt

som et trykfald som følge af iltforbruget ved nedbrydningen. Sideløbende blev udført blindforsøg uden tilsætning af plastmateriale. Forskellen i trykfald mellem de to typer af tests kunne afgøre om plastmaterialet øgede iltforbruget af jordens mikroorganismer (formentlig som følge af plastmaterialets nedbrydning), ikke påvirkede mikroorganismernes iltforbrug (plastmaterialet blev ikke nedbrudt) eller mindskede iltforbruget (plastmaterialet hæmmede jordens mikroorganismer).

Testene med aktivt slam blev udført i Warburg-respirometre, hvor plastmaterialet blev tilsat i en koncentration på 10 g/l og podet med aktivt slam i en koncentration på 2,0 ml/l. Den dannede kuldioxid blev opsamlet i opløsninger af kaliumhydroxid. Respirometrene blev inkuberet ved 20°C og nedbrydningen målt som et manometrisk trykfald.

Nakasaki et al /40/ har undersøgt anvendelsen af polymerer frem for kalk til fældning af slam i rensningsanlæg og denne anvendelses betydning for kompostering af slammet. Dannelsen af kuldioxid ved kompostering ved 60°C af slammet fældet med polymerer eller kalk blev undersøgt, men kun betydningen for stofomdannelsen i slammet kunne detekteres, idet kuldioxiddannelsen fra polymeren alene var meget lille. I slammet fældet med polymerer kunne isoleres en mere varieret artssammensætning af termofile bakterier. Dette vurderedes dog at skyldes toksiske effekter af en kalktilsætning.

Albertsson & Rånby /1/ har undersøgt nedbrydningen af ^{14}C -mærket polyethylen tilsat et nedbrydeligt additiv (10% dotriacontan ($\text{C}_{32}\text{H}_{66}$)). Filmskiver af polyethylen med en tykkelse på 0,2 mm blev podet med *Fusarium redolens*, *Aspergillus versicolor*, *Acremonium kiliense* og/eller *Verticillium lecanii* og dernæst inkuberet i et medium bestående af:

5,0	g ammoniumtartrat
1,0	g KH_2PO_4
0,5	g MgSO_4
0,5	ml 1% FeCl_3 -opløsning
4,5	ml 1% ZnSO_4 -opløsning

opløst i 1000 ml destilleret vand.

Mediet blev beluftet med atmosfærisk luft, der havde passeret en opløsning af kaliumhydroxid for absorption af kuldioxid. Afgangsluften fra testkolben blev ledt gennem en opløsning af kaliumhydroxid for absorption af kuldioxid. Nedbrydningen blev dels målt ved titrering af kaliumhydroxid-opløsningen med saltsyre og ved ^{14}C -analyse af indholdet af ^{14}C -mærket kuldioxid. Efter 2 års inkubering var ca. 0,35% af den oprindeligt tilsatte mængde ^{14}C omdannet til kuldioxid i de prøver, som var podet med bakterier. Kun ca. 0,11%

var omdannet i de prøver, der ikke var podet. Tilsætning af det nedbrydelige additiv syntes hverken at have en fremmende eller en hæmmende effekt på nedbrydningen af polymeren.

Iltforbrug og kuldioxiddannelse er - ligesom methandannelse under anerober forhold - et mål for en mikrobiel nedbrydning af en polymer eller et materiale. Anvendelse af ^{14}C -mærkede stoffer kan give et mere specifikt indtryk af nedbrydningsvejen for det mærkede enkeltstof afhængigt af ^{14}C -mærkningens placering i molekylet. De her beskrevne parametre kan dog kun anvendes som mål for ultimativ nedbrydning i forbindelse med undersøgelse af enkeltstoffer, idet det kun er muligt med sikkerhed at registrere op til 80-90% af det teoretiske iltforbrug eller kuldioxiddannelse. Omsætningen af en blanding af enkeltstoffer i et komplekst sammensat materiale kan således ikke udelukkende undersøges ved anvendelse af iltforbrug eller kuldioxiddannelse. Eventuelle reststoffer eller nedbrydningsprodukter må detekteres via andre parametre, der er knyttet til enkeltstofferne egenskaber som f.eks. molekylær sammensætning, fysisk-kemiske eller toksiske egenskaber.

3.1.5 Måling ved specifikke metoder

Yoshioka et al /56/ har undersøgt nedbrydningen af poly-L-glutaminsyre i en acetatbuffer (pH 4,9) med 0,2% polymer og tilsætning af α -chymotrypsin (0,2 mg/ml). Desuden blev nedbrydningen undersøgt i en acetatbuffer (pH 6,5) med tilsætning af carboxypeptidase B (42 $\mu\text{g/l}$). Nedbrydningen blev fulgt med gel-permeation-chromatografi (GPC), der viser molekylevægtssammensætningen af det organiske stof, som undersøges. Ved tilsætning af henholdsvis α -chymotrypsin og carboxypeptidase B sås et fald i den gennemsnitlige molekylevægt fra $136,1 \cdot 10^4$ g/mol til henholdsvis $46,4 \cdot 10^4$ g/mol og $75,4 \cdot 10^4$ g/mol i løbet af 6 timer.

Schacht et al /49/ har undersøgt nedbrydningen af dextran, oxideret dextran og substitueret dextran. Undersøgelsen blev udført i en citratbuffer (pH = 6) ved 37°C med tilsætning af dextranase-enzym. Nedbrydningen af dextran-molekylerne blev fulgt med gel-permeation-chromatografi (GPC). En forøget substitution eller oxidering af dextran medførte en mindsket nedbrydningshastighed.

Weimer & Schaldach /54/ har undersøgt nedbrydningen af polyethylen og polyurethan før og efter en mekanisk overfladebehandling af polymermaterialet. Nedbrydningen af polymererne blev fulgt ved Raman-spektroskopi. Testbetingelserne for undersøgelserne er ikke refereret, men resultaterne viste en øget nedbrydning af polymerstrukturen efter den mekaniske behandling.

Doi et al /16/ har undersøgt nedbrydningen af poly(3-hydroxybutyrat) (PHB), der akkumuleres i *Alcaligenes eutrophus* som en form for næringslager. Celler af *Alcaligenes eutrophus* indeholdende PHB blev overført til et næringsmedium uden indhold af kulstof og kvælstof. Mediet bestod af:

3,8	g Na_2HPO_4
2,65	g KH_2PO_4
0,2	g MgSO_4

opløst i 1000 ml destilleret vand.

Mikroorganismene blev inkuberet i mediet ved 30°C i 48 og 72 timer under aerobe og anaerobe betingelser. Nedbrydningen af PHB blev fulgt med ^1H NMR-spektroskopi. Efter 48 og 72 timer var indholdet af PHB i bakterierne faldet til henholdsvis 83% og 72% under aerobe forhold, mens indholdet under anaerobe forhold var faldet til henholdsvis 38% og 15%. Under de anaerobe forhold kunne konstateres dannelsen af en lang række metabolitter, hvoraf specielt 3-hydroxybutyrat og acetat udgjorde størstedelen.

Specifikke analyser for enkeltstoffer kan anvendes ved undersøgelse af den ultimative nedbrydning af enkeltstoffer i et materiale eller dannelsen af enkeltstoffer ved denne nedbrydning. Dette kræver dog et forhåndskendskab til materialets sammensætning og til karakteren og egenskaberne af de dannede nedbrydningsprodukter. Specifikke analyser for f.eks. molekylevægtsfordeling vil specielt være egnet ved undersøgelse af nedbrydningen af polymere materialer. En ændring af molekylevægten i stoffer med mindre molekylevægt vil ikke kunne detekteres, da testopløsningen vil indeholde andre stoffer med molekylevægte i samme størrelsesorden.

Anvendelse af specifikke analyser i forbindelse med undersøgelse af komplekse materials omsættelighed vil kræve et stort analyseprogram til beskrivelse af alle indholdsstoffer ved analyse af enkeltstoffer. Ved analyse af molekylevægtsfordeling vil der kræves et supplement til identifikation af stoffer med mindre molekylevægt; f.eks. specifikke analyser eller undersøgelser, der følger disse stoffers egenskaber.

3.2 Abiotiske metoder

ASTM /5/ har udviklet en standard for undersøgelse af plasticmaterials modstandskraft for en lang række kemiske reagenser, hvoraf en del kan have interesse ved undersøgelse af materials nedbrydning i miljøet. Det drejer sig om:

5	% eddikesyre
1	% citronsyre
10	% saltsyre
3	% brintperoxid
10	% salpetersyre
2	% natriumcarbonat
10	% natriumchlorid
3	% svovlsyre

Testmaterialet vejes og måles efter en konditionering ved testbetingelserne på 23°C og 50% luftfugtighed i mere end 40 timer. Dernæst nedsænkes materialet i testopløsningen, idet det undgås, at materialet berører beholderens vægge. Opløsningen omrystes hvert døgn og undersøgelsen afsluttes efter 7 dage. Efter vask og tørring måles vægt og dimensioner igen.

ASTM /6/ har desuden medtaget en standard for undersøgelse af muligheden for at ekstrahere stoffer fra plasticfilm. Testmaterialet i form af en plasticfilm med dimensionerne 50·50 mm konditioneres ved testbetingelserne på 23°C og 50% luftfugtighed i 4 timer, hvorefter testmaterialet vejes. Dernæst placeres materialet i en beholder og tilsættes 400 ml af den valgte væske. Efter 24 timer udtages materialet og efter vask og tørring vejes testmaterialet atter, og en eventuel ekstraktion kan vurderes ud fra det procentvise vægttab.

Metoden kan kun anvendes ved vurdering af et materiales holdbarhed.

3.3 Vurdering af anvendelighed

De her beskrevne metoder er alle anvendt til undersøgelse af materialers holdbarhed eller til undersøgelse af enkeltstoffers (polymerers) nedbrydning. Ved vurdering af komplekse materialers skæbne i miljøet kan de beskrevne metoder for undersøgelse af holdbarhed anvendes ved vurdering af de specifikke påvirkninger, som materialet kan udsættes for i miljøet. Metoderne til undersøgelse af nedbrydning må alle suppleres med andre måleparametre ved vurdering af komplekse materialers nedbrydelighed i miljøet.

Anvendeligheden af de her gennemgåede metoder vil være stærkt afhængig af formålet med en undersøgelse af faste materialer. Er formålet at undersøge holdbarheden af faste materialer under miljørealistiske betingelser, kan metoder til bestemmelse af materialets primære nedbrydelighed anvendes. Er formålet at undersøge omsætningen af faste materialer i miljøet, kan kun metoder til bestemmelse af materialets ultimative nedbrydelighed anvendes.

Bestemmelse af et materiales vægttab, egnethed som substrat for bakterie- og svampevækst eller tab af fysiske egenskaber er udtryk for materialets primære nedbrydelighed. De abiotiske metoder kan anvendes til en screening af et materiales forvitring og er således også et udtryk for materialets primære nedbrydelighed.

Bestemmelse af methandannelse, kuldioxiddannelse, iltforbrug eller koncentrationer af specifikke stoffer kan være udtryk for materialets ultimative nedbrydelighed, men vil som nævnt kræve et supplement af måleparametre, der beskriver omsætningen af mindre komponenter i materialet.

Primær nedbrydelighed

Bestemmelse af vægttab er en usikker målemetode, idet materialet under nedbrydningsundersøgelsen kan absorbere stoffer fra testmediet (som det er vist i undersøgelserne af Ratner et al /47/. Herved kan en mulig primær nedbrydning af materialet skjules og dermed give et falskt resultat.

De abiotiske metoder anvender også vægttab som parameter for en forvitring af materialet, men suppleres også med målinger af testmaterialets størrelse og udseende. Disse parametre er dog også behæftet med usikkerheder.

Bestemmelse af et materiales egnethed for vækst af bakterier og svampe er en mere præcis metode, der kan verificere om materialet er egnet som substrat eller ej. Metoden indebærer dog en del problemer, idet metoden opererer med renkulturer af bakterier og svampe. Det er således muligt, at de undersøgte arter ikke kan anvende materialet som energi- eller kulstofkilde, men at der i miljøet findes enkelte arter af bakterier eller svampe, der kan udnytte materialet. Undersøgelserne må derfor omfatte et stort antal arter for at opnå et mere sikkert vurderingsgrundlag. Anvendelse af aktivt slam som podemateriale i testen vil kunne sikre en divers sammensætning af bakterier og dermed give et mere sikkert vurderingsgrundlag. Anvendelse af jord fra en nåleskov (morbund) som podemateriale vil ligeledes kunne sikre en mere divers sammensætning af svampesporer for en screening af svampevækst.

Metoder til bestemmelse af et materiales fysiske egenskaber vil i hvert enkelt tilfælde afhænge af de egenskaber ved materialet, som ønskes bevaret.

Ultimativ nedbrydelighed

Bestemmelse af et materiales biologiske iltforbrug, kuldioxiddannelse eller methandannelse ved nedbrydning kan være et udtryk for materialets ultimative nedbrydning /40/. Ved testning af materialer, der indeholder mere end et enkeltstof, kan en indirekte parameter som iltforbrug eller

kuldioxiddannelse dog ikke med sikkerhed anvendes som mål for en ultimativ nedbrydning. F.eks. kan et iltforbrug på 99% skyldes nedbrydning af et eller flere enkeltstoffer, der tilsammen udgør 99% af materialets teoretiske iltforbrug, mens de øvrige 1% udgøres af enkeltstoffer, der er svært nedbrydelige. Der er således ikke tale om en ultimativ nedbrydning af hele materialet.

Kun et iltforbrug eller en kuldioxiddannelse på 100% af det teoretisk mulige kan tages som et udtryk for alle organiske enkeltstoffers ultimative nedbrydning. Men det er ikke muligt at detektere et iltforbrug eller en kuldioxiddannelse på 100% med tilstrækkelig stor nøjagtighed - dels på grund af analyseusikkerheden, og dels fordi en del af det organiske kulstof vil indbygges i mikroorganismerne og således ikke bidrage til biologisk iltforbrug eller kuldioxiddannelse.

Anvendelse af specifikke analyser alene vil kun give et udtryk for en primær nedbrydning af de enkelte stoffer. Det kan på basis heraf ikke afgøres, om der dannes stabile metabolitter. Kendes de potentielle nedbrydningsveje for stofferne, kan analyserne suppleres med andre specifikke analyser. For komplekst sammensatte materialer kan antallet af specifikke analyser dog hurtigt blive omfangsrigt, og der fordres et forudgående kendskab til sammensætningen af materialet og de mulige nedbrydningsveje.

En anden mulighed for vurdering af et materiales ultimative nedbrydelighed kan være at kombinere en samleparameter for materialets biologiske nedbrydning med en eller flere måleparametre for de stoffer, som frigøres og opløses i løbet af forvitringen. Disse måleparametre for stoffrigørelsen kan være:

- samleparametre som f.eks. opløst organisk kulstof eller adsorberbart/ekstraherbart organisk halogen i den omgivende vandfase,
- fingerprints (GC/MS),
- parametre, der detekterer de uønskede egenskaber af de frigivne stoffer til vandfasen. De uønskede egenskaber kan f.eks. være potentiel bioakkumulerbarhed og akut/kronisk toksicitet.

De testmetoder, som er gennemgået i dette afsnit, anvender alle parametre for nedbrydningen af materialet, der ikke sikrer en tilstrækkelig præcis bestemmelse af et komplekst sammensat materiales ultimative nedbrydning. Det er derfor nødvendigt at afprøve andre testmetoder, der medtager et eller flere af de principper, som er beskrevet i det ovenstående.

4. FORSLAG TIL TESTSTRATEGI OG -METODER

Nedbrydning af faste materialer kan være en følge af angreb af bakterier, svampe eller alger. En mikrobiel nedbrydning kræver, at omgivelserne for det faste materiale har en karakter, der tilfredsstiller mikroorganismernes levevilkår; specielt med hensyn til fugtighed, næringssalte (specielt kvælstof og fosfor), pH samt temperatur (10-35°C; eventuelt højere, hvis der er tale om en anaerob nedbrydningsproces). Nedbrydningen kan enten være direkte enzymatisk betinget eller en følge af angreb af f.eks. syrer, som produceres af nedbryderne.

4.1 Teststrategi

Nærværende forslag til strategi for vurdering af faste materials omsætning i miljøet er udarbejdet som et oplæg til videre afprøvning; specielt hvad angår de metoder, som kan tænkes anvendt ved vurderingen af ultimativ nedbrydelighed.

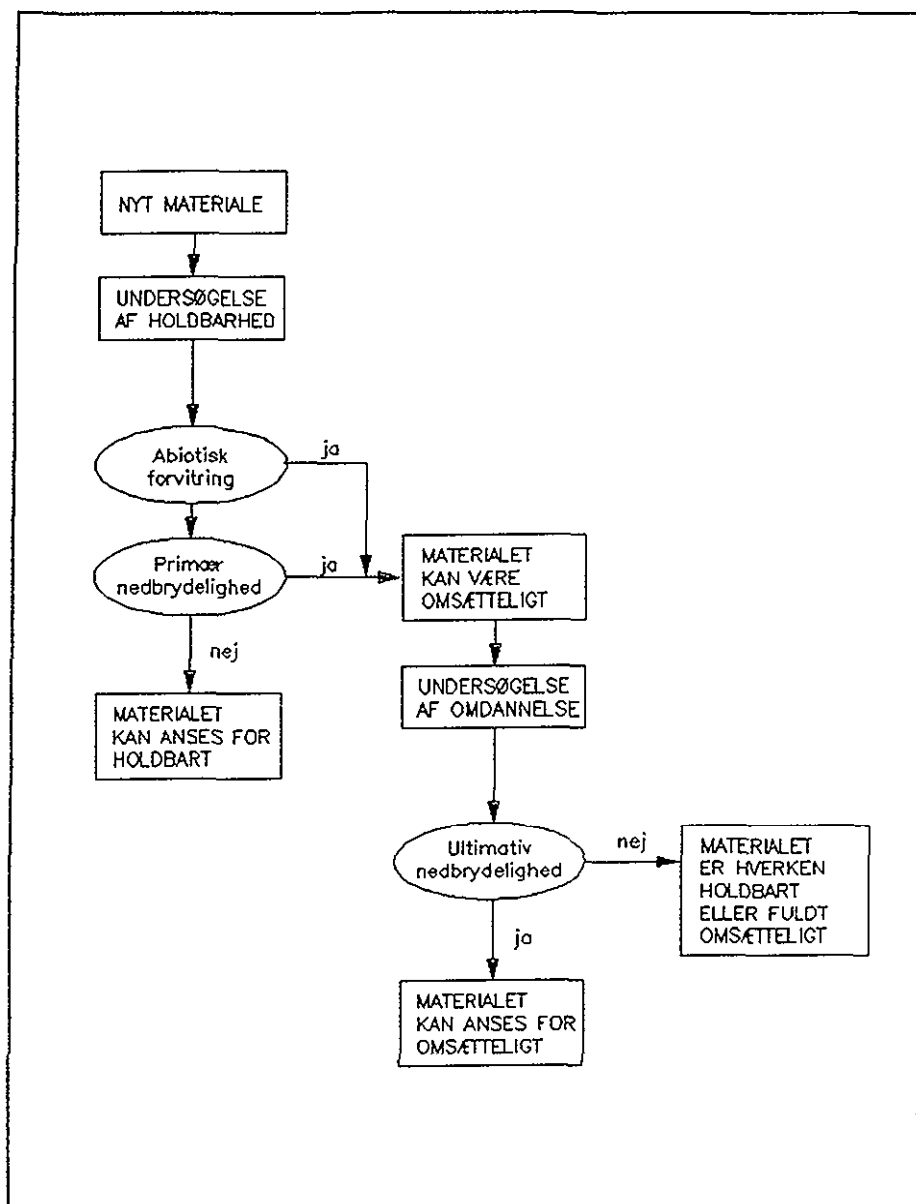
Formålet med en undersøgelse af omsætningen af et fast materiale i miljøet kan være:

- at undersøge holdbarheden med henblik på at vurdere, om materialet er egnet til anvendelse i produkter, der påtænkes genanvendt.
- at undersøge omdannelsen med henblik på at vurdere anvendeligheden af materialet i produkter, der ikke påtænkes genanvendt men f.eks. placeret på lossepladser.

Hvis formålet med undersøgelsen er at undersøge et fast materials holdbarhed bør medtages tests af den mulige abiotiske forvitring og den primære bionedbrydelighed i miljøet. Tests for primær bionedbrydelighed foreslås baseret på materialets vægttab eller materialets evne til at fungere som kulstof- og energikilde for mikroorganismer. Såfremt materialet ikke forvitrer og ikke er primært bionedbrydeligt, kan det karakteriseres som holdbart/persistent. I alle andre tilfælde må materialet karakteriseres som ikke-holdbart, og materialet kan derefter eventuelt undersøges med henblik på at vurdere materialets omdannelse i miljøet.

Hvis formålet med undersøgelsen af et fast materiale er at bestemme materialets fuldstændige omdannelse i miljøet, foreslås anvendt en test for ultimativ bionedbrydelighed, der både undersøger skæbne og effekt af stoffer, der frigøres under nedbrydningen, og den biologiske nedbrydning af selve materialet. Ved undersøgelse af nye materialer vil både materialets nedbrydelighed og eventuelle økotoksikologiske effekter kunne vurderes

ved gennemførelse af en sådan undersøgelse.



Figur 4.1

Forslag til teststrategi ved undersøgelse af faste materialers omsætning i miljøet.

I de følgende afsnit skitseres de mulige metoder til undersøgelse af faste materialers nedbrydelighed samt umiddelbart identificerede problemer forbundet hermed.

4.2 Undersøgelse af holdbarhed (primær nedbrydelighed)

4.2.1 Undersøgelse af abiotisk forvitring

Formålet med denne undersøgelse af et fast materiale vil være at fastslå, om materialet vil forvitte ved påvirkning af sure og svagt oxiderende stoffer. En forvitring kan give en indikation for, om materialets overflade vil forøges væsentligt og dermed øge udvaskningen af enkeltstoffer samt øge muligheden for mikrobiel nedbrydning.

Undersøgelsen kan eventuelt suppleres med kemisk karakterisering af de udvaskede stoffer (GC/MS), samt en undersøgelse af, hvorvidt de udvaskede stoffer under forvitringen er potentielt bioakkumulerbare eller kan give anledning til toksiske effekter.

Som testmetode kan anvendes en modificeret udgave af ASTMs standard for plastmaterialers resistens mod kemiske reagenser /5/. Testens varighed er 7 døgn og de tilsatte reagenser skal fornyes hvert døgn. Denne udskiftning af reagenserne er dog ikke formålstjenlig, hvis en efterfølgende kemisk og biologisk undersøgelse af de udvaskede stoffer skal foretages. Som reagenser kan anvendes:

5	% eddikesyre
1	% citronsyre
10	% saltsyre
3	% brintperoxid
10	% salpetersyre
2	% natriumcarbonat
10	% natriumchlorid
3	% svovlsyre

De høje koncentrationer af salte i de anvendte reagenser kan dog vanskeliggøre en eventuel undersøgelse af de udvaskede stoffers potentielle toksicitet. Dette problem kan muligvis løses ved at anvende marine testorganismer (*Photobacterium* (bakterie; Microtox), *Phaeodactylum* (alge) og/eller *Artemia* (krebsdyr)), der er tilvænnet en høj salinitet.

Alternativt kan anvendes syntetisk fremstillet perkolat (svarende til perkolat fra lossepladser) som reagens for undersøgelse af forvitring. Anvendelse af syntetisk perkolat kan dog kræve en forlængelse af testen i forhold til de anbefalede 7 døgn i ASTM-standard (afhængig af det syntetiske perkolats surhedsgrad mv.).

4.2.2 Undersøgelse af primær bionedbrydelighed

Formålet med en undersøgelse af et fast materiales primære bionedbrydelighed vil være dels at undersøge materialets anvendelighed som energi- og kulstofkilde for mikroorganismers vækst, dels at undersøge graden af materialets forvitring.

Den primære bionedbrydelighed af et fast materiale kan undersøges ved hjælp af ASTMs standarder for undersøgelse af plastmaterialers resistens mod bakterier og svampe /3, 4/. Disse metoder anvender renkulturer af mikroorganismer.

Alternativt kan testen udføres med jord som podemateriale og testmedium i stedet for renkulturer og agarplader. Dette vil dog vanskeliggøre undersøgelse af vækst af mikroorganismer på materialets overflade. En test med jord som podemateriale kan dog anvendes til at undersøge materialets forvitring i jord som følge af mikrobielle angreb kombineret med den kemiske påvirkning i jord.

En ekstraktion af jorden efter testens udførelse kan kun i specielle tilfælde anvendes til kemisk karakterisering eller toksicitetsundersøgelser af de udvaskede stoffer, da enkeltstoffer fra jorden også vil ekstraheres, og da jorden vil udgøre en mængdemæssig stor andel af testsystemet. Humusstoffer fra jord kan vanskeliggøre en GC/MS-screening af ekstraktet, ligesom en detektion af bioakkumulerbare stoffer vanskeliggøres af humusstoffernes tilstedeværelse. En ekstraktion af jord vil i de fleste tilfælde indebære anvendelse af organiske opløsningsmidler, der selv efter en oprensning af ekstraktet kan indebære muligheder for interferens i de økotoksikologiske tests.

4.3 Undersøgelse af omdannelse (ultimativ nedbrydelighed)

Formålet med en undersøgelse af omdannelsen af et fast materiale vil være at undersøge skæbne og effekt af de stoffer, som frigives fra det faste materiale under forvitring og biologisk nedbrydning.

Stofferne vil i det naturlige miljø frigives langsomt i takt med forvitringen og vil først efter frigørelsen være tilgængelige for en biologisk nedbrydning.

Under forudsætning af, at en forudgående undersøgelse har vist, at materialet ikke er persistent, vil det være hensigtsmæssigt at opnå dokumentation for, hvorvidt materialet potentielt kan forventes nedbrudt fuldstændigt, eller om der i materialet vil være langsomt nedbrydelige eller persistente delelementer/nedbrydningsprodukter.

For tidsmæssigt at accelerere omsætningen kan en forudgående artificiel forvitring af materialet ved en fysisk-kemisk behandling være formålstjenlig.

4.3.1 Forbehandling

Følgende forbehandlingsmetoder kan anvendes (enkeltvist eller i kombination):

- fraktionering i bestanddele,
- findeling af materialet i mindre partikler,
- partiel kemisk oplukning svarende til en sur korrosion (incl. opsamling af eventuelt udvaskelige komponenter).
- partiel fotokemisk oplukning svarende til bestråling med intenst sollys (incl. opsamling af eventuelt udvaskelige komponenter).

Det foreslås, at en findeling af materialet kombineres med tilsætning af en 1% opløsning af brintperoxid (svag kemisk oxidation) samt bestråling med UV-lys (fotokemisk nedbrydning). Den anvendte mængde reagens opsamles sammen med det partikulære materiale og anvendes som testmateriale efter en neutralisering af væsken. En findeling af et materiale som f.eks. plastic kan være svært at standardisere, og det bør undersøges, om det er muligt at foretage en direkte pulverisering af materialet.

Forudgående fraktionering af materialet i dets enkelte bestanddele vurderes ikke at være egnet, da det er den samvirkende effekt af alle enkeltstofferne og deres tilgængelighed i materialets struktur, der kan være betydende for materialets potentielle bionedbrydelighed.

4.3.2 Undersøgelse af ultimativ bionedbrydelighed

Det forbehandlede materiale og den anvendte, neutraliserede væske anvendes som testmateriale i selve nedbrydelighedstesten. Som testmetode foreslås anvendt principperne i Zahn-Wellens Test /44/, eventuelt kombineret med principperne for testning af svært opløselige stoffer i den såkaldte "BLOK Test", der er foreslået i ISO som standardmetode /25/.

I Zahn-Wellens Test anvendes som podemateriale aktivt slam i en koncentration svarende til 200-1000 mg tørstof pr. l. Fortyndingsvandet består af et næringsmedium indeholdende 10 ml/l af næringssaltopløsning a og 1 ml/l af opløsningerne b-d:

Opløsning a:

8,50 g KH_2PO_4
21,75 g K_2HPO_4
33,40 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,50 g NH_4Cl

opløst i 1000 ml destilleret vand

Opløsning b:

36,42 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

opløst i 1000 ml destilleret vand

Opløsning c:

22,50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

opløst i 1000 ml destilleret vand

Opløsning d:

0,25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

opløst i 1000 ml destilleret vand.

Testmaterialet tilsættes normalt i en koncentration op til 400 mg DOC/l. Da kun en mindre del af materialets organiske stof vil være opløseligt ved testens start, bør anvendes højere koncentrationer af selve materialet. I BLOK-testen kan tilsættes en detergent bestående af en blokpolymer (nonylphenol-ethoxylat-propoxylat, f.eks. NP10EO,5PO), der i sig selv ikke er signifikant nedbrydelig; herved kan tilgængeligheden og dermed nedbrydeligheden af tungt opløselige enkeltstoffer øges. I den her foreslåede version af testen kan blokpolymerer forsøgsvis anvendes. Anvendelse af svært nedbrydelige hjælpestoffer i testningen kan dog være miljømæssigt betænkeligt.

Testopløsningerne inkuberes ved 20°C i mere end 28 dage. Under testen beluftes vandfasen kontinuerligt med atmosfærisk luft og afgangsluften fra kolben ledes gennem en svaler for at minimere fordampningen af vand.

Nedbrydningsforløbet følges i den oprindelige Zahn-Wellens Test ved måling af mængden af opløst organisk kulstof (DOC) i væskefasen. I den her foreslåede version af testen er det ikke hensigtsmæssigt at anvende DOC, idet kun en mindre del af materialets organiske stof vil være opløseligt fra starten. Det foreslås derfor, at der anvendes en samleparameter som f.eks. biologisk iltforbrug eller kuldioxiddannelse, der også udtrykker nedbrydningen af den del af materialet, som ikke er opløseligt ved testens start.

Desuden foreslås det, at der som supplement anvendes screening for potentielt bioakkumulerbare stoffer samt screening for toksicitet under nedbrydningsforløbet og ved undersøgelsens afslutning. Sådanne undersøgelser vil kræve et stort startvolumen, da der løbende skal udtages store prøvemængder, hvorfor testen bør udføres i kolber på op til 20 l. For at sikre en tilstrækkelig opblanding i testsystemet bør kolberne have mekanisk omrøring (eventuelt magnetomrøring).

Iltforbruget kan bestemmes ved analyse af iltkoncentrationen i testsystemets væskefase som i Closed Bottle Testen /41/ eller ved bestemmelse af trykfald i lukkede beholdere, hvor den dannede kuldioxid absorberes i kaliumhydroxid som i MITI Testen /42/. Analyser af iltkoncentration som parameter for nedbrydningen kræver, at der ikke tilføres ilt til testsystemet under testen, og at iltforbruget af den anvendte mængde podemateriale er lavt, idet iltkoncentrationen på ca. 8-9 mg O₂/l i væskefasen ikke må opbruges under testen. Dette er uforeneligt med ønsket om at anvende en høj koncentration af podemateriale for at gøre betingelserne for en hurtigere nedbrydning mere favorable.

Bestemmelse af iltforbruget ved måling af trykfald kan imødekomme ønsket om høje koncentrationer af podemateriale, idet anvendelsen af denne parameter tillader tilstedeværelse af et luftvolumen i testsystemet, der sikrer en stadig høj koncentration af ilt i væskefasen. De normalt anvendte testsystemer ved måling af trykfald (respirometre) er relativt små (i størrelsesordenen 500 ml væske og 100 ml luft), hvilket ikke tilfredsstiller kravet om større prøvevolumener til test af toksicitet og indhold af bioakkumulerbare stoffer. Dette kan dog imødegås ved udvikling af større testsystemer, men der kan opstå problemer med beluftsningen af systemets væskefase i store systemer uden luftgennembobling, ligesom en homogen fordeling af teststof og podemateriale i testsystemet kan være vanskelig.

Kuldioxiddannelse kan detekteres ved absorption og fældning af kuldioxid i bariumhydroxid med efterfølgende titrering af overskydende bariumhydroxid med saltsyre som i Sturm Testen /43/. Dette kræver et lukket testsystem, hvor tilgangsluften ledes gennem opløsninger af natriumhydroxid og bariumhydroxid for en fjernelse af kuldioxid. Afgangsluften fra testsystemet ledes gennem flere flasker med bariumhydroxid. Denne målemetode er forenelig med ønskerne om at anvende relativt høje koncentrationer af podemateriale og store prøvemængder, hvorfor det tentativt anbefales, at kuldioxiddannelse anvendes som testparameter.

5. KONKLUSION

Omsætning af et fast materiale i miljøet er en egenskab ved materialet, som enten er uønsket, fordi materialet ønskes genbrugt, eller ønsket, fordi materialets enkeltkomponenter efter f.eks. deponering på losseplads ønskes nedbrudt fuldstændigt og ikke må give anledning til uønskede effekter i miljøet (toksicitet eller bioakkumulerbarhed). En undersøgelse af et fast materials omsætning i miljøet kan derfor have til hensigt at afklare om:

- materialet er holdbart
- materialet omdannes fuldstændigt

I denne rapport er opstillet et forslag til strategi for undersøgelse af faste materials omsætning i miljøet.

Indledningsvist testes materialets holdbarhed, og, såfremt materialet ikke er holdbart, testes dets potentielle omdannelse. Hvis materialet er designet til at kunne omdannes i miljøet, bør undersøgelserne selvfølgelig starte med en test af materialets omdannelse; såfremt det ikke omdannes fuldstændigt, og restprodukterne har uønskede egenskaber, kan holdbarheden dernæst testes.

Det opstillede forslag til undersøgelsesstrategi gør det derfor muligt at gruppere faste materialer i to klasser:

- holdbare materialer
- fuldt omsættelige materialer

samt en klasse af materialer, der ikke er holdbare, men heller ikke omdannes fuldstændigt til uskadelige slutprodukter.

I rapporten er gennemgået en række metoder til undersøgelse af faste materials omsætning. De refererede metoder tager enten udgangspunkt i testning af et materials holdbarhed eller i testning af ét enkelt stofs bionedbrydelighed.

Da et materiale typisk er sammensat af flere enkeltstoffer (f.eks. polymerer, stabilisatorer, blødgørere, farver o.lign.) kan ingen af de refererede metoder anvendes til testning af et fast materials ultimative bionedbrydelighed.

De eksisterende metoder for undersøgelse af et materials holdbarhed bør fortsat anvendes til testning af faste materials holdbarhed.

I rapporten er opstillet et forslag til testmetode for undersøgelse af et fast materials potentielle omdannelse.

Forslaget tager udgangspunkt i Zahn-Wellens Test for potentiel nedbrydelighed af enkeltstoffer, hvad angår biomassens størrelse og koncentrationen af organisk stof. For at optimere betingelserne for en mikrobiel nedbrydning af materialet, bør materialet findeles og udsættes for en partiel kemisk og fotokemisk oplukning (svag sur korrosion og bestråling med UV-lys). Med henblik på at kunne øge den opløste del af det tilsatte testmateriale yderligere (og dermed øge nedbrydningshastigheden) foreslås afprøvet en tilsætning af et persistent detergent (blokpolymerer som nonylphenol-ethoxylat-propoxylater, f.eks. NP 10EO, 5PO). Anvendelse af svært nedbrydelige hjælpestoffer i testningen kan dog være miljømæssigt betænkeligt.

Nedbrydningen foreslås fulgt ved analyse af kuldioxiddannelse. Denne måleparameter muliggør beluftning af testmediet under testen, samtidig med at parameteren kan relateres til hele den tilsatte mængde testmateriale. Parametre, der kun kan relateres til den opløste fraktion af testmaterialet (f.eks. DOC), kan ikke anvendes, da den opløste fraktion må forventes at blive øget igennem nedbrydningsforløbet.

En samleparameter som kuldioxiddannelse kan ikke alene anvendes som mål for et sammensat materiales ultimative nedbrydning. Nedbrydning af enkeltkomponenter, der udgør mindre end f.eks. 10-20% af materialets organiske kulstof, kan ikke med sikkerhed detekteres med en sådan samleparameter. det er derfor nødvendigt at supplere kuldioxid-dannelsen med andre parametre som f.eks. screening for frigivelse af toksiske eller bioakkumulerbare stoffer.

Det opstillede forslag til teststrategi samt den foreslåede metode til testning af ultimativ nedbrydelighed foreslås afprøvet med to eller flere faste materialer. De anvendte materialer bør ved en sådan afprøvning omfatte mindst et materiale, der betragtes som holdbart, og et materiale, der forventes omsat.

6. REFERENCER

- /1/ Albertsson, A.-C. & Rånby, B., 1979:
Biodegradation of synthetic polymers. IV. The $^{14}\text{CO}_2$ method applied to linear polyethylene containing a biodegradable additive.
Appl.Polymer Symposia 35(1979):423-430.
- /2/ Anderson, J.M.; Hiltner, A.; Marchant, R.; Phua, K.; Brown, C. & Slobodkin, R., 1983:
In vivo and in vitro studies of the biodegradation of biomedical polymers.
Org.Coat.Appl.Polym.Sci.Proc. 48(1983):389-391.
- /3/ ASTM, 1988a:
G 21: Standard practice for determining resistance of synthetic polymeric materials to fungi.
Annual Book of ASTM Standards, vol. 08.03.
American Society of Testing and Materials, 1988.
- /4/ ASTM, 1988b:
G22: Standard practice for determining resistance of plastics to bacteria.
Annual Book of ASTM Standards, vol. 08.03.
American Society of Testing and Materials, 1988.
- /5/ ASTM, 1988c:
D543: Standard test method for resistance of plastics to chemical reagents.
Annual Book of ASTM Standards, vol. 08.01.
American Society of Testing and Materials, 1988.
- /6/ ASTM, 1988d:
D1239: Standard test method for resistance of plastic films to extraction by chemicals.
Annual Book of ASTM Standards, vol. 08.01.
American Society of Testing and Materials, 1988.
- /7/ Bailey, W.J. & Gapud, B., 1985:
Synthesis of biodegradable addition polymers.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 446(1985):42-50.
- /8/ Chu, C.C., 1982:
A comparison of the effect of pH on the biodegradation of two synthetic absorbable sutures.
Ann.Surg. 195(1982):55-59.
- /9/ Cooney, J.D. & Wiles, D.M., 1988:
The aging characteristics of degradable plastics.
(1988):420-422.
- /10/ Deshmukh, S.R. & Singh, R.P., 1986:
Drag reduction characteristics of graft copolymers of xanthan gum and polyacrylamide.
J.Appl.Polym.Sci. 32(1986):6163-6176.

- /11/ Deshmukh, S.R. & Singh, R.P., 1987:
Drag reduction effectiveness, shear stability and biodegradation resistance of guar gum-based graft copolymers.
J.Appl.Polym.Sci. 33(1987):1963-1975.
- /12/ DiBenedetto, L.J.; Cameron, J.A. & Huang, S.J., 1988:
Biodegradation of hydroxylated polymers.
Polym.Sci.Technol. (Plenum) 38(1988):61-74.
- /13/ DiBenedetto, L.J.; Huang, S.J. & Cameron, J.A., 1987:
Biodegradation of hydroxylated polyurethanes.
Polym.Mater.Sci.Eng. 57(1987):404-407.
- /14/ Doi, Y.; Kawaguchi, Y.; Nakamura, Y. & Kunioka, M., 1989:
Nuclear magnetic resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*.
Appl.Environ.Microbiol. 55(1989):2932-2938.
- /15/ Doi, Y.; Kunioka, M.; Kawaguchi, Y.; Segawa, A.; Abe, C. & Kaneshawa, Y., 1989:
Production, properties, and biodegradation of microbial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate.
Polym.Prepr. (Am.Chem.Soc., Div.Polym.Chem.) 30(1989):494-495.
- /16/ Doi, Y.; Segawa, A. & Kunioka, M., 1989:
Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced from γ -butyrolactone and butyric acid by *Alcaligenes eutrophus*.
Polym.Comm. 30(1989):169-171.
- /17/ Feng, X.D.; Song, C.X. & Chen, W.Y., 1983:
Synthesis and evaluation of biodegradable block copolymers of ϵ -caprolactone and DL-lactide.
J.Polym.Sci., Polym.Lett.Ed. 21(1983):593-600.
- /18/ Gilbert, R.D.; Stannett, V.; Pitt, C.G. & Schindler, A., 1982:
The design of biodegradable polymers: two approaches.
Dev.Polym.Degrad. 4(1982):259-293.
- /19/ Glenn, J., 1989:
The bye-bye plastics. Degradables tested in compost programs.
Bio Cycle, oktober 1989, pp. 28-32.
- /20/ Hamoud, M.R.; Al-Jibouri, A.K. & Hussain, N.A., 1982:
Biodegradation of certain industrial polymers.
Iraqi J.Sci. 23(1982):56-67.

- /21/ Henman, T.J. & Oldland, S.R., 1984:
The use of radioactive tracers in stabilization
technology.
Dev.Polym.Stab. 7(1984):275-302.
- /22/ Holland, S.J.; Jolly, A.M.; Yashin, M. & Tighe,
B.J., 1987:
Polymers for biodegradable medical devices. II.
Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydro-
lytic degradation studies.
Biomaterials 8(1987):289-295.
- /23/ Holmes, P.A., 1985:
Applications of PHB - a microbially produced bio-
degradable thermoplastic.
Phys.Technol. 16(1985):32-36.
- /24/ Huang, S.J.; Roby, M.S. & Macri, C.A., 1980:
Biodegradation of polyurethane.
Org.Coat.Plast.Chem. 43(1980):938-941.
- /25/ ISO, 1990:
BLOK Test. German proposal.
ISO/TC 147/SC 5/WG 4 N 141. ISO, Paris, Marts
1990.
- /26/ Jones, P.H.; Prasad, D.; Heskins, M.; Morgan, M.
& Guillet, J., 1974:
Biodegradability of photodegraded polymers. I.
Development of experimental procedures.
Environ.Sci.Technol. 8(1974):919-923.
- /27/ Küster, E., 1979:
Biological degradation of synthetic polymers.
Appl.Polymer Symposia 35(1979):395-402.
- /28/ Kaetsu, I.; Yoshida, M.; Asano, M.; Yamanaka, H.;
Imai, K.; Yuasa, H.; Mashimo, T.; Suzuki, K.;
Katakai, R. & Oya, M., 1987:
Biodegradable implant composites for local the-
rapy.
J.Controlled Release 6(1987):249-163.
- /29/ Kohn, J. & Langer, R., 1984:
A new approach to the development of bioerodible
polymers for controlled release applications
employing naturally occurring amino acids.
Polym.Mater.Sci.Eng. 51(1984):119-121.
- /30/ Kopecek, J. & Ulbrich, K., 1983:
Biodegradation of biomedical polymers.
Prog.Polym.Sci. 9(1983):1-58.
- /31/ Kopecek, J., 1982:
Biodegradation of polymers for biomedical use.
i: Benoit, H. & Rempp, P. (Eds.): Macromol., Main
Lect.Int.Symp., 27th, Pergamon, Oxford, England,
1982, pp. 305-320.

- /32/ Kumar, G.S.; Kalpagam, V. & Nandi, U.S., 1982:
Biodegradation of gelatin graft copolymers.
Proc.IUPAC.Macromol.Symp., 28th, 1982, p. 305.
- /33/ Kumar, G.S.; Kalpagam, V. & Nandi, U.S., 1985a:
Biodegradation of gelatin graft copolymers. III.
J.Appl.Polym.Sci. 30(1985):609-619.
- /34/ Kumar, G.S.; Kalpagam, V. & Nandi, U.S., 1985b:
Biodegradation of gelatin graft copolymers. IV.
J.Appl.Polym.Sci. 30(1985):915-924.
- /35/ Lenz, R.W. & Guerin, P., 1983:
Functional polyesters and polyamides for medical
applications of biodegradable polymers.
Polym.Sci.Technol. (Plenum) 23(1983):219-230.
- /36/ Linhardt, R.J.; Rosen, H.B. & Langer, R., 1983:
Bioerodable polyanhydrides for controlled drug
delivery.
Polym.Prepr. (Am.Chem.Soc., Div.Polym.Chem.)
24(1983):47-48.
- /37/ Lundquist, K. & Kristersson, P., 1985:
Exhaustive laccase-catalyzed oxidation of a lignin
model compound (vanillyl glycol) produces methanol
and polymeric quinoid products.
Biochem.J. 229(1985):277-279.
- /38/ Miller, N.D. & Williams, D.F., 1987:
On the biodegradation of poly-2B-hydroxybutyrate
(PHB) homopolymer and poly-2B-hydroxybutyrate-
hydroxyvalerate copolymers.
Biomaterials 8(1987):129-137.
- /39/ Milans, F.H., 1988:
Degradable plastics. Standards, research and deve-
lopment. Report to the Chairman, Committee on Go-
vernmental Affairs, U.S.Senate.
United States general Accounting Office, september
1988.
- /40/ Nakasaki, K.; Shoda, M. & Kubota, H., 1985:
Comparison of composting of two sewage sludges.
J.Ferment.Technol. 63(1985):537-543.
- /41/ OECD, 1984a:
Ready Biodegradability: Closed Bottle Test. OECD
Guideline for Testing of Chemicals 301D.
OECD, Paris, 1984.
- /42/ OECD, 1984b:
Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I).
OECD Guideline for Testing of Chemicals 301C.
OECD, Paris, 1984.
- /43/ OECD, 1984c:
Ready Biodegradability: Modified Sturm Test. OECD
Guideline for Testing of Chemicals 301B.
OECD, Paris, 1984.

- /44/ OECD, 1990:
Draft updated OECD guideline for testing of chemicals. 302 B. Inherent biodegradability: Zahn-Wel-
lens/EMPA test.
OECD, Paris, april 1990.
- /45/ Pfeil, A.; Menke, K.; Krause, H.H.; Bohn, M.A. &
Schmidt, K., 1989:
Int.Annu.Conf.ICT 20(1989):87/1-87/10.
- /46/ Plucinski, J.; Pawlaczyk-Szpilowa, M.; Sebastian,
M.; Staroojciec, O. & Karpinska-Smulikowska, J.,
1984:
Biodegradation of nonionic surfactants of tetronic
type under stationary conditions. I. The effect
of surfactant structure on the biodegradation
course.
Environ.Prot.Eng. 9(1984):49-62.
- /47/ Ratner, B.; Gladhill, K. & Horbett, T., 1988:
Analysis of *in vitro* enzymatic and oxidative
degradation of polyurethanes.
J.Biomed.Mater.Res. 22(1988):509-527.
- /48/ Ringsdorf, H.; Schmidt, B. & Ulbrich, K., 1987:
Bis(2-chloroethyl)amine bound to copolymers of
N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and methacryloy-
lated oligopeptides via biodegradable bonds.
Macromol.Chem. 188(1987):257-264.
- /49/ Schacht, E.; Vandoorne, F.; Vermeersch, J. &
Duncan, R., 1987:
Polysaccharides as drug carriers. Activation
procedures and biodegradation studies.
ACS Symp.Ser. 348(1987):188-200.
- /50/ Smith, R. & Williams, D.F., 1986:
The preparation of carbon-14-labeled polymers for
studies of biodegradation.
Polym.Test. 6(1986):243-252.
- /51/ Soria, V.; Celda, B.; Tejero, R. & Figueruela,
J.E., 1985:
Methyl methacrylate-methyl isopropenyl ketone co-
polymers: degradation under environmental condi-
tions.
Polym.Degrad.Stab. 10(1985):287-298.
- /52/ St.Pierre, T. & Chiellini, E., 1987:
Biodegradability of synthetic polymers for medical
and pharmaceutical applications: Part 2 - Backbone
hydrolysis.
J.Bioact.Compat.Polym. 2(1987):1-30.
- /53/ Stranger-Johannessen, M., 1979:
Susceptibility of photodegraded polyethylene to
microbial attack.
Appl.Polymer Symposia 35(1979):415-421.

- /54/ Weimer, E. & Schaldach, M., 1984:
Biodegradation von Polyethylen und Polyäther-
Polyurethan.
Biomed.Tech. 29(1984):218-225.
- /55/ Williams, D.F., 1982:
Review. Biodegradation of surgical polymers.
J.Mater.Sci. 17(1982):1233-1246.
- /56/ Yoshioka, S.; Iwaki, K.; Hayashi, Y.; Aso, Y.;
Takeda, Y. & Uchiyama, M., 1988:
Application of gel permeation chromatograph-low
angle laser light scattering system to the kinetic
study on degradation of bioerodible polymers.
Chem.Pharm.Bull. 36(1988):4951-4957.

