

Miljøprojekt Nr. 910 2004

Substitution af biocider i bundmaling til skibe med enzymer

Knud Allermann og Ib Schneider
BioLocus ApS

Eva Walstrøm og Birte Høgh Andersen
EnPro ApS

Trine Thorup Andersen
DHI - Institut for Vand og Miljø

Jesper Højevang
Dansk Sejlunion

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	7
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	9
<i>Biofouling</i>	9
<i>Miljøvenlig antifouling</i>	9
<i>Enzymer</i>	10
<i>Enzymers forlidelighed med gængse bindersystemer</i>	10
<i>Formulering af en maling med enzymer som begroningshindrende middel</i>	11
<i>Udvaskning af enzym fra malingen</i>	11
<i>Malingens påførings – og filmegenskaber</i>	11
<i>Øko-toksikologiske effekter af enzymer</i>	11
<i>Resultater vedrørende påføring</i>	13
<i>Resultater vedrørende antibegronings egenskaber</i>	13
<i>Perspektiv</i>	14
SUMMARY AND CONCLUSIONS	17
<i>Non-toxic antifouling</i>	17
<i>Enzymes</i>	18
<i>The compatibility of enzymes with paint binder systems</i>	18
1 FOULING OG ANTIFOULING	23
1.1 ANTIBEGRONINGSMIDLER	24
2 MALING TIL ANTIFOULING	26
2.1 ALTERNATIVE MALINGSTYPER	26
2.1.1 <i>Zink- og kobberpyrithion som de gode alternativer til TBT</i>	26
2.1.2 <i>"Low surface energy" produkter</i>	26
2.1.3 <i>Økotoksikologisk vurdering af nuværende alternativer</i>	27
2.1.4 <i>Alternativer på naturligt forekommende organiske forbindelser</i>	28
2.1.5 <i>Antifouling stoffer af naturens egne biocider</i>	29
2.1.6 <i>Alternating Current Anti Fouling (ACAF)</i>	30
2.1.7 <i>Mekaniske løsninger og andre mulige løsninger</i>	30
2.2 UNDERSØGELSE AF KOBBERES FRIGIVELSESHASTIGHED	30
2.3 ERFARINGER MED "BIOCIDFRI" PRODUKTER TIL STØRRE SKIBE	31
2.3.1 <i>Baggrund for undersøgelsen</i>	31
2.3.2 <i>Metode</i>	32
2.3.3 <i>Resultater</i>	32
2.4 DISKUSSION OG KONKLUSION	33
3 RÅVARER TIL SKIBSBUNDMALING TIL LYSTBÅDE	34
3.1 BINDEMIDLER	34
3.2 OPLØSNINGSMIDLER	34
3.3 PIGMENTER	35
3.4 FYLDSTOFFER	35
3.5 FORTYKNINGSMIDLER	35
3.6 ADDITIVER	35
4 UDVÆLGELSE AF ENZYMER	36
4.1 HVAD ER ET ENZYM?	36

4.2	FREMSTILLING AF ENZYMER	37
4.3	ANVENDELSE AF ENZYMER	37
4.4	ANVENDELSE AF ENZYMER I SKIBSMALING	38
4.5	UDVÆLGELSE AF ENZYMER	38
4.5.1	<i>Enzymers evne til at nedbryde cypriders klæbestoffer</i>	39
4.5.2	<i>Forsøg med enzymer og bindemidler</i>	39
4.5.3	<i>Indledende feltforsøg</i>	39
4.6	ER ENZYMER BIOCIDER?	40
4.7	OPHOBES ENZYMER I NATUREN?	41
4.8	HUMAN TOKSIKOLOGI	41
5	ØKO-TOKSIKOLOGI – ENZYMER	42
5.1	INDLEDNING	42
5.2	OPRINDELIG TESTSTRATEGI	42
5.3	REVIDERET TESTSTRATEGI	42
6	ØKO-TOKSIKOLOGISKE UNDERSØGELSER	44
6.1	TESTPROGRAM	44
6.2	ENZYMER	44
6.3	TESTMETODER	44
6.3.1	<i>Bionedbrydelighed i havvand</i>	44
6.3.2	<i>Væksthæmningstest med mikroalgen <i>Skeletonema costatum</i></i>	45
6.3.3	<i>Akut toksicitetstest med krebsdyret <i>Daphnia magna</i></i>	46
6.3.4	<i>Akut toksicitetstest med zebrafisk (<i>Danio rerio</i>)</i>	46
6.4	TESTRESULTATER	47
6.4.1	<i>Bionedbrydelighed i havvand.</i>	47
6.4.2	<i>Væksthæmningstest med mikroalgen <i>Skeletonema costatum</i></i>	48
6.4.3	<i>Akut toksicitetstest med krebsdyret <i>Daphnia magna</i></i>	48
6.4.4	<i>Akut toksicitetstest med zebrafisk (<i>Danio rerio</i>)</i>	49
7	KONKLUSION	50
8	ANVENDTE MALINGSSYSTEMER	51
9	ENZYMERS INDVIRKNING PÅ MALINGENS KONSISTENS	53
9.1	MÅLING AF REOLOGI	53
9.1.1	<i>Viskositet</i>	53
9.1.2	<i>Oscillation</i>	55
9.2	LAGERSTABILITET – ACCELERERET METODE	56
9.3	KONKLUSION	57
10	VANDOPTAG OG ENZYMANALYSE	59
10.1	VANDOPTAGELSE	59
10.2	PRINCIPPER FOR MÅLING AF ENZYMAKTIVITET	60
10.3	BESTEMMELSE AF REFERENCE KURVE	61
10.4	MÅLING AF ENZYMAKTIVITET	62
10.5	BESTEMMELSE AF ENZYM VED MÅLING AF PROTEIN	62
10.6	BESTEMMELSE AF PROTEIN - REFERENCE KURVE	63
10.7	MÅLING AF PROTEIN	63
10.8	KONKLUSION	63
11	UDVASKNING AF ENZYM	64
11.1	ENZYMAKTIVITET VED UDVASKNING – REFERENCEKURVE	64
11.2	PROTEININDHOLD VED UDVASKNING – REFERENCEKURVE	65
11.3	INDLEDENDE MÅLING AF ENZYMAKTIVITET OG PROTEIN I UDVASKNINGSBUFFER	66

11.4	MÅLING AF VANDOPTAGELSE	66
11.5	MÅLING AF ENZYMAKTIVITET I UDVASKNINGSBUFFER	67
11.6	MÅLING AF PROTEIN I UDVASKNINGSBUFFER	70
11.7	SAMLET VURDERING AF UDVASKNING AF ENZYM	72
12	PÅFØRINGS- OG FILMEGENSKABER	74
12.1	PÅFØRING MED MALERRULLE	74
12.2	SLIBBARHED	74
12.3	OVERMALING	74
12.4	FILMKVALITET	74
12.5	MEKANISKE EGENSKABER	74
12.5.1	<i>Tørring</i>	74
12.5.2	<i>Pendulhårdhed</i>	75
12.5.3	<i>Vedhæftning til underlag ved 23° og 5°C</i>	75
12.6	FORELØBIGE KONKLUSIONER VEDRØRENDE FILMEGENSKABER	76
13	UDSÆTNING AF PANELER I SÆSONEN 2002	77
13.1	EVALUERING AF RESULTATER NOVEMBER 2002	77
14	EKSPONERING I HAVVAND 2003	79
14.1	VALG AF MALING TIL EKSPONERINGSFORSØG	79
14.1.1	<i>Vandoptag</i>	79
14.1.2	<i>Udvaskning af enzym</i>	80
14.1.3	<i>Kommentarer til måling af vandabsorption og enzymaktivitet</i>	83
15	PRAKTISK AFPRØVNING – FORLØBSBESKRIVELSE	84
15.1	FORBEHANDLING	84
15.2	REFERENCEMALING	84
15.3	UDLEVERING AF MALING	84
15.4	PÅFØRING AF MALING	84
15.5	SØSÆTNING	84
15.6	SPØRGESKEMAER	85
15.7	INSPEKTIONER	85
16	KVANTIFICERING AF BEGRONING	86
16.1	BEGRONINGSTYPER OG MÆNGDER	86
17	RESULTATER VEDR. PÅFØRINGSEGENSKABER	87
17.1.1	<i>Primer</i>	87
17.1.2	<i>Testmalinger</i>	87
17.1.3	<i>Kontrolmaling (reference)</i>	87
17.1.4	<i>Opsamling - påføringsegenskaber</i>	87
18	RESULTATER VEDR. ANTIBEGRONINGSEGENSKABER	89
18.1	UDGÅEDE BÅDE	89
18.2	BÅDE DER IKKE HAR VÆRET AFVASKET	89
18.2.1	<i>Første inspektion</i>	90
18.2.2	<i>Anden inspektion</i>	90
18.2.3	<i>Tredje inspektion - vinteroptagning</i>	90
18.3	BÅDE DER HAR VÆRET AFVASKET	91
18.4	GENERELT	91
18.4.1	<i>Kontrolmaling</i>	91
18.4.2	<i>Fjernelse af begroning</i>	92
18.4.3	<i>Afsmitning</i>	92
18.5	TESTSEJLERNES VURDERING	92
	<i>Bådejernes oplevelser af begroning</i>	92

18.5.2	<i>Fartreduktion</i>	93
18.5.3	<i>Anderledes end tidligere anvendte malinger?</i>	93
18.5.4	<i>Hård kontra blød maling</i>	94
18.5.5	<i>Testsejlernes kommentarer</i>	94
19	KONKLUSION PÅ PRAKTISK AFPRØVNING	95
20	PERSPEKTIVER	96
21	REFERENCER	98
21.1	SEKTION 1	98
21.2	SEKTION 2	100

BILAG

Bilag A	Undersøgelse af enzymeres evne til at nedbryde cypriders klæbestoffer
Bilag B	Forsøg med enzym og bindemidler og indledende feltforsøg
Bilag C	Måling af enzymaktivitet i udvaskningsbuffer
Bilag D	Raft test 2002
Bilag E	Bådejernes kommentarer
Bilag F	Billede af testbåde - <i>ikke vaskede</i>
Bilag G	Billede af testbåde - <i>vaskede</i>

Forord

Denne rapport med titlen " Substitution af biocider med enzymer i bundmaling til skibe" er udarbejdet på baggrund af et projektsamarbejde mellem; BioLocus ApS, EnPro ApS, DHI Vand & Miljø og Dansk Sejlunion.

Projektet har været delvist finansieret af Miljøstyrelsen og er udført i perioden 2001 – 2003 under "Program for renere produkter".

Formålet med nærværende projekt har været at undersøge om der kunne udvikles et alternativ til de eksisterende bundmalinger til lystbåde som ikke indeholder biocider – men derimod baseret på enzymer og som derfor ikke ville have skadelige effekter på havmiljøet.

BioLocus ApS har som initiativtager til projektet tidligere fået undersøgt hypotesen om enzymeres egenskaber til at forhindre begroning – specielt rurs larvers fasthæftning til en overflade – i laboratorie forsøg hos TNO, Holland. Resultaterne af disse undersøgelser viste klart at nogle enzymer grupper kunne forhindre fast hæftning af cyprid larven til en overflade uden toksikologiske effekter på disse larver. På basis af blandt andet disse undersøgelser er der indsendt patentansøgninger (PCT) af BioLocus .

Disse indledende undersøgelser har dannet baggrund for etablering af projektgruppen og dens arbejde som har resulteret i nærværende rapport.

Projektdeltagerne takker hermed Miljøstyrelsen for den finansielle støtte.

Sammenfatning og konklusioner

Biofouling

Alle overflader i naturen bliver begroet efter kortere eller længere tid af mange forskellige organismer ("biofouling"). I havet er begroingen af flader under vand særlig aggressiv, og specielt begroing (fouling) af skibe er et meget stort problem, som koster ejerne af skibe og dermed indirekte samfundet meget betydelige beløb at begrænse og bekæmpe. I EU regnes der med, at omkostningerne ved biofouling på skibe løber op i ca. 1 milliard Euro om året og globalt regner man med 6,6 milliarder Euro per år. Hvis man ikke er i stand til at begrænse begroingen på bunden af et skib, resulterer det i en betydelig gnidningsmodstand, hvilket betyder nedsat hastighed, tab af manøvreevne og ikke mindst et stærkt øget forbrug af fossile brændstoffer og dermed øget udslip af drivhusgasser. Desuden fremmer begroingen korrosionsprocesserne på materialerne. Som også mange lystsejlere ved, så vil ens skibsbund meget hurtigt blive begroet med et tykt lag af små krebsdyr (rurer) og alger, hvis man ikke gør noget for at forhindre det. Bevoksningens art og hastigheden hvormed den kommer vil variere afhængig af hvor i verden man sejler – men den kommer uanset, og selv i vore kølige farvande bliver eksempelvis en lystbåd totalt begroet på få måneder.

TBT blev forbudt på skibe under 25 m i Danmark fra 1991. I den Internationale Marine Organisation (IMO) er man blevet enige om, at TBT er for skadeligt for miljøet og at det bør fjernes fra alle skibe. IMO har således fået indført et udfasningsprogram for alle skibe: fra 2003 måtte der ikke mere påføres TBT-holdig bundmaling på skibe, og fra 2008 skal det være væk fra alle skibe eller forsejlet. TBT sagen har været med til at skærpe myndighedernes opmærksomhed omkring biocider i det hele taget og har medført en række nationale og regionale restriktioner startende med lystbådsområdet. Forpligtelserne gælder dog først fra IMO-konventionens ikrafttrædelse dvs. efter at et vist antal lande har ratificeret konventionen. I erkendelse heraf har EU vedtaget at følge udfasningsprogrammet uden at afvente at konventionen træder i kraft. 2003-forbudet gælder således allerede i EU og for EU-skibe.

I Danmark er der i 2000 vedtaget en bekendtgørelse for import, salg og brug af bundmalinger til lystbåde. Denne bekendtgørelse tillader ikke længere brug af biociderne Irgarol og Diuron. Bekendtgørelsen blev i 2003 yderligere strammet og der er nu også fastsat restriktion for udludning af kobber.

Miljøvenlig antifouling

Kravet til branchen er således klart, der skal udvikles alternativer til de eksisterende antifouling metoder. Som overgangsløsning anvendes hovedsageligt bundmaling med kobberforbindelser, men eksempelvis i Sverige og Danmark er der allerede indført begrænsninger i anvendelse af kobber til lystbåde. Der er mange forsøg i gang med alternativer overalt i verden. Som overgangsløsning til de store skibe er man gået to veje:

- 1) Der udvikles overflader, som har en meget lav overfladeenergi, resulterende i en meget glat, afvisende overflade, såkaldte "fouling

release" overflader. Til disse metoder anvendes silikone- og teflonforbindelser. Længst fremme i dag er silikone produkterne. Disse produkter har vundet indpas til skibe som sejler meget hurtigt (15-20 knob) og sejler næsten konstant med meget korte ophold. Det er et dyrt produkt, vanskeligt at påføre og reparere. Man har desuden regnet med, at virkningen af fouling release produkter skyldes den lave overfladeenergi, men i så fald skulle teflon overflader være mere effektive. Det viser sig da også, at virkningen af silikoneprodukterne også skyldes en konstant frigivelse af lavmolekylære silikoneforbindelser, som skaber en ultratynd forsæbningshinde på overfladen. Påvirkningen af miljøet af disse forbindelser, er der endnu ingen som har undersøgt.

- 2) De fleste andre metoder indenfor bundmaling går på at finde "miljøvenlige gifte" altså alternative organiske forbindelser som hæmmer organismene, men som nedbrydes hurtigt ved frigivelse og dermed ikke ophobes i miljøet som eksempelvis TBT og kobber.

Enzymer

Enzymer er proteiner som er nødvendige for alt liv. Disse molekyler er vandopløselige og omsættes let til CO₂ og vand i naturen og indgår derfor i det økologiske kredsløb. Enzymer er karakteriseret ved at kunne omsætte et substrat til et produkt uden selv at blive forbrugt. Denne omsætning af substratet – hydrolyse – kan blandt andet anvendes til at nedbryde de stoffer marine organismer bruger til at hæfte sig fast til en overflade. Fra litteraturen vides at de "klæbe stoffer" som organismene bruger til at fasthæfte sig med ofte indeholder protein og kulhydrat. Det er derfor oplagt at undersøge om proteolytiske enzymer kan bruges som antibegronings middel til substitution af de kemikalier herunder kobber der i dag anvendes i bundmalinger. Konceptet om brug af enzymer i malinger er baseret på en patenteret teknologi af BioLocus.

Enzymers forlidelighed med gængse bindersystemer

De første undersøgelser der blev udført var at dispergerer enzym med binder for at undersøge forlidelighed og få svar på om enzymerne fortsat ville være aktive i denne blanding. Enzymet Alcalase, en serin protease fra Novozymes A/S, blev brugt som model enzym og blev testet for kompatibilitet med 7 forskellige bindere som sædvanligvis anvendes i marine malinger ved at teste rest enzym aktiviteten efter 24 timers inkubation ved 36 ° C.

Resultaterne viste at Alcalasen bevarer sin aktivitet med blandinger af: modifieret harpiks, hydrogeneret harpiks, polyvinyl acetate emulsion mens der ikke kunne ses aktivitet med, polyvinyl methyl ether, polyvinyl klorid copolymer, acrylic harpiks copolymer og silikone binder.

Med udgangspunkt i ovenstående resultater blev der fremstillet to prototype malinger – en vandbaseret og en solventbaseret med forskellige kombinationer af enzymer.

Disse formuleringer blev testet på rafts i en sejlsæson i henholdsvis Jyllinge og Helsingør havne og resultaterne viste overraskende nok, at den solventbaserede maling var mest velegnet til at forhindre begroning, specielt af rurer.

Formulering af en maling med enzymer som begroningshindrende middel

Herefter blev der fremstillet en række af malingsystemer baseret på kombinationer af harpiks, akryl og enzymer samt solvent. Disse kombinationer blev undersøgt for enzymernes indvirkning på malingens konsistens, vandoptag, påførings- og film egenskaber samt udvaskning af enzym fra den tørre film.

De undersøgelser, der er udført viser, at enzymer påvirker malingens konsistens og holdbarhed. Det opløsningsmiddel baserede produkt udviser en stigning i viskositet ved tilsætning af enzym, men påvirkes til gengæld ikke med hensyn til lagerstabilitet. De vandfortyndbare produkter påvirkes ikke nær så meget hvad angår konsistens, men til gengæld kan det konkluderes at selve bindersystemet er afgørende for om produktet er lagerstabil eller ej.

Generelt kan det konstateres, at vandoptagelsen kan styres, blandt andet, ved at optimere bindemiddelsystemet. Samtidig kan det konstateres, at en opløsningsmiddelbaseret maling normalt vil være tættere end en vandfortyndbar maling alene på grund af måden, den danner malingsfilm på. Der er også en række andre parametre der har indflydelse på vandoptagelsen, for eksempel valg af pigment og fyldstof, pigmentvolumenkoncentration og samlet tørstof.

Udvaskning af enzym fra malingen

Det kan også konstateres at det er muligt at bestemme enzymaktivitet som funktion af absorptionsved 425 nm med en rimelig nøjagtighed. Som alternativ til bestemmelse af enzymaktivitet (her Alcalase) kan protein som funktion af absorptionsved 595 nm bestemmes. Denne måling vil være et udtryk for den samlede mængde enzym - protein der bliver udvasket fra malingen.

For de undersøgte malinger kan det konstateres at der ser ud til at være en sammenhæng mellem udvaskning af protein og vandoptagelse i malingsfilmen, hvor et større vandoptag fremmer udvaskningen.

Enzymaktiviteten aftager stadig efter 31 døgn. Dette kan tolkes som at enzymets transporthastighed til overfladen har betydning for hastigheden hvormed enzymet udløses. Dette kan få betydning for enzymets langtidseffekt. Alcalase analysen antyder at efter 3 måneder er udvaskningen reduceret kraftigt. Om enzymet har den ønskede antibegroningseffekt må således afhænge af om transporten af enzym til overfladen er tilstrækkelig.

Malingens påførings- og filmegenskaber

Generelt er prototypemalingerne nemme at påføre under laboriebetingelser. Slibe, film og tørringsegenskaber svare til kommercielle produkter af samme type (binder og opløsningsmiddel).

Øko-toksikologiske effekter af enzymer

De 3 enzymer, Alcalase, AMG og Pulpzyme (Novozymes A/S) der er anvendt i feltforsøgene er undersøgt for eventuelle øko-toksikologiske effekter.

Resultaterne af undersøgelsen af bionedbrydning i havvand samt akutte effekter af enzymerne kan summeres som følger:

- AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC nedbrydes hurtigt og fuldstændigt i havvand. Kriteriet for bionedbrydelighed i havvand (60% af ThOD) blev for alle tre enzymer opnået i løbet af 3 dage mens fuldstændig nedbrydning af enzymerne (100% af ThOD) blev opnået inden for 12 dage.
- Alcalase 2,5 L, Type DX medførte en hæmmende effekt på vækstraten af *Skeletonema costatum* med en EC50 værdi på 17 mg/l og en NOEC på 5 mg/l (nominelle koncentrationer)
- Blandingen af de tre enzymer [AMG 300 L + Alcalase 2,5 L, Type DX + Pulpzyme® HC] medførte en hæmmende effekt på vækstraten af *Skeletonema costatum* med en EC50 værdi på 45 mg/l og en NOEC på 10 mg/l (nominelle koncentrationer)
- Alcalase 2,5 L, Type DX samt blandingen af de tre enzymer medførte ingen akutte effekter på *Daphnia magna* og *Danio rerio* i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer)
- AMG 300 L og Pulpzyme® HC medførte ingen akutte effekter på *Skeletonema costatum*, *Daphnia magna* og *Danio rerio* i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer)

På baggrund af de opnåede resultater vil AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC ikke skulle klassificeres som miljøfarlige i henhold til Kommissionens Direktiv 67/548/EEC om klassificering af farlige stoffer.

Afprøvning af malinger på rafts og på både i havvand.

Med udgangspunkt i ovenstående resultater indgik BioLocus i efteråret 2002 en aftale med Jotun A/S om levering af en større mængde test bundmaling maling baseret på enzymer. To test bundmalings produkter blev leveret foråret 2003 til Dansk Sejlunion (AF2022 – en selvpolerende maling samt AF2047 – en hård maling) begge opløsningsmiddelbaseret og med tilsætning af Alcalase som eneste enzym.

Dansk Sejlunion har som led i projekt om udvikling og afprøvning af enzymbaseret bundmaling stået for den praktiske afprøvning af disse to miljøvenlige test bundmalingsprodukter. I alt 19 lystbåde fordelt på fem forskellige lystbådehavne i Danmark har deltaget i afprøvningen. De fem testhavne er Helsingør, Kalvehave, Horsens, Marselisborg og Skive. Havnene er valgt for nogenlunde at dække den variationen i begroningstyper og mængder, der findes i de danske farvande.

Sideløbende med maling af testbådene er der nedsænket rafts i de pågældende havne med samme malinger opstrøget på paneler som er udleveret til bådejerne. Derudover er en række andre enzymer testet i disse raft forsøg.

Test produktet AF 2047 (hård bundmaling) har været afprøvet på ¼ af bådene i hver havn, og AF 2022 (selvpolerende bundmaling) har været afprøvet på de resterende både.

Der blev som udgangspunkt udleveret en 1-komponent primer til de deltagende bådejere. Deltagerne påførte selv denne primer forud for påføringen af testmalingen. Primerens funktion var, at forsegle tilbagesiddende gammel bundmaling. Herved sikres et ensartet udgangspunkt for testen, samt at den gamle bundmaling ikke influerer på testmalingernes virkning

Primer og testmaling samt en referencemaling fra Jotun A/S (almindelig kobberbaseret bundmaling, "Non-Stop") blev påført af bådejerne med rulle. Referencemalingen blev påført på et mindre areal af båden midtskibs for at kunne sammenligne virkning.

Deltagerne har udfyldt to spørgeskemaer i løbet af testen. Dels et påføringskema hvor bådejerne bl.a. skulle vurdere, hvordan malingen var at arbejde med. Dels et resultatskema der skulle besvares ved sæsonens afslutning. Bådejerne skulle udfylde dette skema inden bådene blev taget på land. Heri skulle de beskrive deres oplevelser med testmalingen, herunder om testmalingen har været anderledes at sejle med end normalt, om de har observeret begroning i vandlinien, om de har mærket fartreduktion m.m. Svarprocenten for både påførings- og resultatskema var 95%.

Dansk Sejlunion har foretaget 3 inspektionsrunder i løbet af sejlsæsonen 2003:

1. runde – ultimo juni (her blev der taget 7 både op i 4 ud af 5 testhavne)
2. runde – august/september (her blev i alt 8 både inspiceret i 3 ud af 5 testhavne)
3. runde – oktober/november (her er alle både inspiceret i forbindelse med vinteroptagning).

Resultater vedrørende påføring

Primeren er uproblematisk at arbejde med og dækker godt. Der var generelt stor tilfredshed med påføringsegenskaberne.

Begge testmalinger oplevede deltagerne som problematiske at påføre, dog mest udtalt for den selvpolerende maling. Malingerne dækker ikke så godt og er svære at påføre. Malingerne er sandsynligvis for tyktflydende.

Referencemalingen anses for normal at påføre om end den tilsyneladende er lidt tyndtflydende.

Resultater vedrørende antibegronings egenskaber

I løbet af testen har flere bådejere skrubbet eller vasket bunden fri for begroning en til flere gange i sæsonen. Begrundelsen har været nedsat fart, øget brændstofforbrug, begroning i vandlinien m.m.

Denne afvaskning betegnes som en fejlkilde i bedømmelsen af malingernes virkning, idet de enkelte inspektioner ikke giver et retvisende billede af malingernes reelle antibegroningsegenskaber. De både der ikke har været afvasket før vinteroptagningen eller mellem de enkelte inspektioner, har været tydeligt mere begroede i forhold til de både, der løbende er blevet vasket.

Fem ud af 19 testbåde er i udgæet af testen i løbet af sæsonen. Ifølge bådejerne pga. for kraftig og uacceptabel begroning. Det drejer sig om to i Skive (begge AF 2022) og to i Helsingør (én AF 2022 og én AF 2047). De udgæede både sejler alle kapsejlads. En sidste båd fra Horsens udgik i juni pga. salg.

Konklusion:

På baggrund af inspektionerne og bådejernes vurdering er følgende udsagn formuleret om de to enzymbaserede testbundmalinger:

- Begror tidligt med særdeles meget slim og alger. Testsejlerne observerede ret tidligt på sæsonen (juni) mere begroning i vandlinien end normalt.
- Farten er reduceret i forhold normalt og manøvreegenskaberne er forringede. Testsejlerne er samlet set utilfredse med sejladssegenskaberne.
- Fire sejlere valgte helt at udgå af forsøget på grund af generende begroning. Dette skete i hhv. juni og august. Det skal nævnes, at alle var kapsejlere.
- Den selvpolerende maling 2022 smitter meget af, men har trods dette tydeligt bedre antibegroningsegenskaber end den hårde maling 2047.
- Rurer forekommer kun i begrænset mængde på testmalingerne. Dette gælder dog ikke i Horsens, hvor testbådene allerede ved 1. inspektion var dækket af rurer (50-100%). Det gælder heller ikke på de både hvor testmalingen var poleret helt væk.
- Afrensning af begroning har været foretaget på hovedparten af testbådene. Ved afrensning er en del maling vasket af, da malingerne, som nævnt, let smitter af. Dette har sandsynligvis formindsket mængden af tilbagesiddende aktivstof og dermed reduceret antibegroningsegenskaberne.
- På helt uberørte både er hovedparten af malingen (særligt 2022) dog også forsvundet/poleret af som følge af almindelig sejlads. Dette gælder også på testbåde, der er påført to lag bundmaling. Poleringsegenskaberne er derfor ikke gode nok.

Det må konkluderes, at testmalingerne i deres nuværende formuleringer ikke kan leve op til sejlernes behov for en rimelig begroningsfri bund, der kan sikre manøvreringsevnen.

Perspektiv

Formålet med nærværende projekt har været at undersøge om der kunne udvikles et alternativ til de eksisterende bundmalinger til lystbåde som ikke indeholder biocider – men derimod baseret på enzymer og som derfor ikke ville have skadelige effekter på havmiljøet.

Det har ikke indenfor projekt perioden været muligt at udvikle et alternativ til de kommercielle biocid baserede produkter. Resultaterne fra undersøgelserne peger dog på at det er muligt at udvikle en enzymbaseret bundmaling som ikke har skadelige effekter på havmiljøet.

Undersøgelserne viser at der kan fremstilles – hårde - og selvpolerende malinger som ikke indeholder biocider men udelukkende er baseret på enzymer som den antibegroende komponent.

Sejlerne der har deltaget i undersøgelsen peger på at den selvpolerende maling polerer for hurtigt. I løbet af en sejlsæson er malingen poleret væk og skibets bund er derfor uden antibegroende maling sidst på sejlsæsonen.

Malingernes tekniske egenskaber kan forbedres så der opnås bedre påførings egenskaber og bedre dækkeevne. Det er også muligt at justerer hastigheden hvormed en malingen polerer.

Fra undersøgelserne fremgår det at i de eksisterende prototyper udvaskes enzymerne for hurtigt set i forhold til en sejlsæson. Der kunne i laboratoriet måles enzym aktivitet fra udludnings bufferen der viste at malingsoverflade ville være "tømt" for enzym efter ca. 3 måneder. Det er derfor rimeligt at antage at overfladen i de påførte malinger mangler enzym som derfor giver anledning til de begroninger og fartreduktioner som sejlerne konstaterer.

For at forhindre en for hurtig udludning må enzymerne derfor forankres i malingen. Dette kan gøres ved at immobiliserer enzymerne til binder eller fyldstofferne i malingen eller ved at ændre på enzymernes overfladestruktur så ladningsegenskaberne ændres. Immobilisering og funktionalisering af enzymer er kendte teknologier.

Det er vigtigt at pege på resultaterne fra de økotoksikologiske undersøgelser. Disse resultater viser at enzymerne nedbrydes 100% i løbet af 12 dage i havvand og der kunne ikke konstateres akutte toksiske effekter på alger, dafnier og fisk. Konklusionen er derfor at: på baggrund af de opnåede resultater vil AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC ikke skulle klassificeres som miljøfarlige i henhold til Kommissionens Direktiv 67/548/EEC om klassificering af farlige stoffer.

Disse resultater giver derfor et lovende perspektiv for det videre arbejde med udvikling af et miljøvenligt biocidfrit alternativ.

Dansk Sejlunion anser den enzymbasere malingsteknologi for et lovende biocidfrit alternativ. Testens resultater viser, at teknologien bør forbedres dels for at øge antibegroningsegenskaberne især over for slim, alger og bryozoeer dels for at opnå en lavere poleringshastighed af den selvpolerende maling.

Pladeforsøg udført af BioLocus har sideløbende med bådtesten vist, at enzymerne, i andre blandinger end de afprøvede i højere grad kan forhindre begroning.

Dansk Sejlunion håber derfor, at der til gavn for miljøet og lystsejlerne vil blive arbejdet videre på at forbedre teknologien.

Summary and conclusions

Biofouling

All surfaces in nature will be fouled after shorter or longer periods by many different organisms (“biofouling”). In the sea fouling is especially aggressive, and therefore fouling of ship hulls is a very big problem, which is very costly for the ship-owners to solve or limit. In the EU the costs of antifouling are calculated to be one billion Euro per year, and globally the costs are estimated to Euro 6.6 billion per year. If the fight against fouling of a ship hull is not successful, it will result in reduced speed of the ship, loss of manoeuvrability and increased consumption of fossil fuels and, thus, increase of the greenhouse effect. Besides, fouling will also have a tendency to increase corrosion of the ship hulls. As many yacht owners know, if nothing is done, soon small barnacles and algae will cover the ship hull. The character of the fouling and the speed of its progress depend on where in the world the ship is sailing – but no matter where, even in our cold regions a yacht will be fouled within few months.

The use of TBT was banned for yachts (<25 m) in Denmark in 1991. In the International Marine Organisation (IMO) it was agreed that TBT is harmful to the environment, and this compound should be removed from all ships. The IMO has therefore recommended a programme for removal of TBT on ships: Since 2003 TBT must not be applied on ships, and from 2008 it must be removed from all ships or sealed. The story about TBT has resulted in an increasing awareness about biocides in general and has resulted in a series of national and regional restrictions mostly starting on the yacht market. It must be noted, though, that the IMO convention will not enter fully into force until a minimum of countries has ratified it. Anyhow, the EU has decided to implement the ban of TBT without waiting for the ratification of the convention. So, the 2003 ban is in force in the EU and for EU ships.

In Denmark, regulations have been imposed in 2000 on import, sale and use of antifouling coatings for yachts. This regulation banned the use of Irgarol and Diuron. The latest regulation in 2003 restricts the use of copper compounds by limiting the leaching per surface area.

Non-toxic antifouling

The industry has now realised that it must develop alternative antifouling technologies, as the existing toxic biocides all will be banned sooner or later. In the meantime the most frequently used biocide to replace TBT is expected to be copper compounds, but Denmark and Sweden have already introduced restrictions on the use of copper compounds on yachts. All over the World many trials are being performed to find alternatives. For the big ships two alternatives will be used most commonly in the coming period:

1. One method is coatings with low surface energy properties resulting in very smooth, non-sticky surfaces, the so-called “fouling release” surfaces. In these technologies silicone and teflon compounds are used. Most used today are the silicones. These coatings are used for ships sailing very fast (15-20 knots) and sailing constantly with only short breaks. The silicones are very expensive compared to other

products and more difficult to apply and repair. Judging alone from the low surface energy values, teflon coatings should be smoother than silicone coatings. But it has been shown that a silicone surface is smooth due to the constant release of low molecular silicone compounds resulting in a “soapy” surface. The environmental impact of these compounds has not yet been investigated.

2. Most other alternatives within antifouling focus on finding “non toxic biocides”, i.e. organic compounds which are toxic for the target organisms on the surface of the ship hull, but are degradable when released into the seawater and, thus, do not accumulated in the environment like TBT and copper.

Enzymes

Enzymes are proteins and are necessary for all life. These molecules are soluble in water and are easily degraded in nature into carbon dioxide and water and are natural ingredients in the ecological cycle. Enzymes are organic catalysts, i.e. they can transfer one product into another without being consumed in the process. So, enzymes can be used to hydrolyse (break down) the molecules that marine organism use for their attachment to a surface. It is known from literature that these attachment compounds (glues) contain protein and polysaccharides. It was therefore obvious to investigate if proteolytic enzymes could be used in antifouling instead of the toxic compounds used today, like copper. The concept of using enzymes as antifouling compounds is based on a patented technology developed by BioLocus.

The compatibility of enzymes with paint binder systems

First, experiments were performed to investigate if the enzymes could be dispersed into paint binders normally used in the marine paint industry, and still retain their activity in the mixture. The enzyme Alcalase, a serine protease from Novozymes A/S, was chosen as model and was tested with seven different normally used binders. This investigation revealed that the Alcalase is still active when mixed with modified rosin, hydrogenated rosin and polyvinyl acetate emulsions. No activity was measured with polyvinyl chloride, acrylics and silicone binders.

Based on these results, two prototype paints were produced – a water based and an organic solvent based with different combinations of enzymes. These formulations were tested on rafts in a sailing season in two Danish yacht harbours, Jyllinge and Helsingør. It turned out that the fouling on the solvent-based paint formulation was significantly smaller than on the waterborne paint, and it was especially effective against barnacles.

Paint formulation with enzymes

Combinations of rosin, acryl and enzymes have been investigated in relation to viscosity, water uptake, application, paint film properties and leaching of enzyme from the paint.

xxxxxxxIn general the viscosity increases when adding the enzyme to the formulation. The water uptake can be controlled, but adding the enzyme does not change the self-stability of the final formulation.

Otherwise the paint properties have not been changed significantly compared to paint without enzyme.

Leaching of enzyme from the paint

Investigations of the leaching of the enzymes from the paint have been performed in laboratory experiment. These investigations resulted in the conclusion that the enzymes are still leaching from the paint after 31 days. Alcalase analysis suggests that activity can be found after three months, but the activity is reduced considerably and the amount of enzyme on the paint surface is probably dependent on the transport from the lower part of the paint.

Eco-toxicology effects

The three enzymes used in the raft field experiments, Alcalase, AMG and Pulpzyme, have been investigated for eco-toxicology effects. The investigations could be concluded as follows:

- All three enzymes were 100 % biodegradable within 12 days in seawater. The criterium for biodegradability in seawater (60 % of ThOD) was achieved within three days.
- Alcalase showed inhibition of the growth rate of *Skeletonema costatum* with an EC50 of 17 mg/liter and a NOEC of 5 mg/liter.
- The mixture of the three enzymes showed inhibition of the growth rate of *Skeletonema costatum* with an EC50 of 45 mg/liter and a NOEC of 10 mg/liter.
- Alcalase and the mixture of the three enzymes showed no acute toxic effects on *Daphnia magna* and *Danio rerio* in the tested concentrations 1-100 mg/liter.
- The enzymes AMG and Pulpzyme showed no acute toxic effects on *Skeletonema costatum*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* in the tested concentrations 1-100 mg/liter.

Based on the achieved results it can be concluded that the tested enzymes shall therefore not be classified as hazardous to the environment according to the Commission Directive 67/548/EEC concerning classification of dangerous chemicals.

Filed test on yachts and rafts

In the last year of the project period (2003) the Danish Sailing Association had selected 19 yachts in five different harbours in Denmark. The selection was based on criteria to secure a representative sample from "Danish waters" in terms of biofouling and salinity.

The test was performed with paint delivered by Jotun A/S. Two types were used, a self-polishing paint: AF 2022 and a hard paint: AF 2047. Both with organic solvents and the enzyme used were Alcalase.

The yacht owners were asked to participate in the trial applying the test paint on their yacht and to fill in a questionnaire form – one after applying the paint and one form at the end of the trial. There were two test paints - a self-polishing and a hard paint both containing the Alcalase. One quarter of the

yachts in each harbour were painted with the hard paint and the rest with the self-polishing paint.

All yachts were initially painted with a 1 component Jotun primer before applying the test paint to secure no interference from the old paint already on the bottom. A copper control strip was also applied at the centre of the yacht with Jotun "Non-Stop".

In the same harbours rafts containing the same paints as on the yachts were also immersed.

The participants were asked to fill in two questionnaire forms, one with application performance, and one at the end with antifouling results. 95 % of the participants filled in the two questionnaire forms.

Results from field test

Three inspections on location were performed during the test period – one in June (seven yachts) one in August/September (eight yachts) and one in October/November (all yachts).

Application:

Both test paints were according to the owners difficult to apply – the self-polishing being the most difficult.

Antifouling performances:

During the test period some of the owners had washed the bottom of the yacht due to fouling.

This is considered to be a drawback for the evaluation of the efficiency of the paint. Those yachts not being washed during the period were considerably more fouled than yachts being washed between inspections.

Five out of 19 test yachts left the trial during the period – one sold. The rest of the test yachts that had left the trial were yacht racers.

Conclusion

Based on the inspections performed and the reply from the owners the following can be concluded for the two test paints:

- Fouling comes quickly with slime and algae. Owners observed more fouling in the waterline earlier than they normally do.
- Sailing speed is reduced in comparison to normal, and sailing performance also reduced. Owners are in general not satisfied with the sailing performance.
- Four owners decided to leave the trial due to fouling – all yacht racers.
- The self-polishing paint is washed away too quickly, but in spite of that they have a better antifouling performance than the hard paint.
- Barnacles are only observed in small amounts on the test paints except in one harbour (Horsens 50 –100% Barnacles).
- Cleaning of the bottom for fouling was done for the major part of the participants. During the cleaning paint was washed away. This has

probably reduced the amount of remaining paint to a low level and thereby reduced the fouling efficacy.

- On the non-washed yachts (especially the yachts with self-polishing paint) the main part of the paint was washed away as a consequence of normal sailing. This is also the case for yachts applying two layers of the paint. The polishing performance is therefore not good enough.

It can therefore be concluded that the test paints in the tested formulations do not fulfil the requirements of the yacht owners to secure a reasonably fouling-free bottom and satisfactory sailing performance.

Perspective

It has not been possible within the time frame of the project period to develop a biocide-free alternative to the existing toxic commercial paint products.

The results from the present investigation indicate that it is possible to develop an enzyme-based antifouling product.

The quality of the paint formulation can and must be improved. The self-polishing paint was polished off too quickly, and the enzymes were washed out of the paint at a too high rate, which was also demonstrated in the laboratory experiments.

It is important, however, to develop methods to retain the enzymes in the paint for a longer period. This can be done by immobilisation of the enzymes to the binder molecules or by altering the properties of the enzymes in order to reduce their hydrophilic character.

It is important to conclude that the ecotoxicology studies showed 100 % biodegradability within 12 days and no acute toxic effects on algae, daphnia and fish.

The Danish Sailing Association regard the enzyme-based paint technology a promising biocide-free alternative. The results of the test show that the technology should be improved to increase the antifouling performance, especially towards slime, algae and bryozoans, and to increase the polishing performance of the paint.

Raft tests performed in parallel to the yacht test show that enzymes in other formulations/combinations than the present yacht test had a higher potential to reduce the biofouling.

The Danish Sailing Association therefore hopes that work to improve the technology continues to the benefit of the environment and the sailors.

1 Fouling og antifouling

Alle overflader i vandige miljøer er udsat for intens begroning af bakterier, protozoer, alger, muslinger og krebsdyr (invertebrater). Denne begroning kaldes under ét fouling.

Overfladerne i vandet kan være enten sten, alger/tang, bolværk i havne, skibsbunde, boreplatforme, farvandsafmærkninger, fiskenet eller kølevandsindtag til kraftværker.

Når et objekt f.eks. et skib nedsænkes i havvand starter begroingsprocessen med det samme på skibets bund.

Først på overfladen kommer de såkaldte makromolekyler som binder sig til skibsbunden. Det er typisk stoffer der er fordelt i vandet, f.eks. proteiner og fedtstoffer. De giver anledning til at overfladen på skibets bund bliver ujævn. Denne ujævne overflade giver mulighed for at organismer kan sætte sig på overfladen af skibsbunden.

Makromolekylerne giver grobund for at bakterier, alger og svampe kan sætte sig på bunden. Samtidig med at disse mikroorganismer omsætter makromolekylerne udskiller de slim stoffer ofte bestående af polysaccharider. Dette lag udgør den såkaldte biofilm på skibsbunden.

Biofilm forekommer mange steder, på tænder (plak), rørsystemer til drikkevand, vandindtag til kraftværker, papirfremstilling, olieindustrien, fødevarerforarbejdning samt skibe.

På en skibsbund er biofilmen et godt grundlag for fasthæftning af alger, muslinger og krebsdyr. F.eks. kan en rur-larve fasthæfte sig. Efter fasthæftning undergår rur-larven en forvandling til det voksne stadium. Den voksne rur vil sidde på skibsbunden indtil den fjernes mekanisk fra overfladen. Begroingsprocessen er nu i fuld gang.

Graden og sammensætningen af begroingen er afhængig af geografiske og sæsonmæssige faktorer.

Begroning af bunden på et skib volder store problemer for skibsfarten.

Begroingen giver anledning til en reduktion i skibets fart. Derfor skal der bruges mere energi for at fremdrive skibet. Dette forøgede energiforbrug giver anledning til en forøgelse af drivhusgasser, f.eks. CO₂. Når rør og skrue på et skib bliver begroet kan skibet miste evne til manøvrering. Desuden kan begroingen give anledning til alvorlige korrosionsproblemer.

Antifouling er betegnelsen for de midler, typisk i form af bundmaling, som benyttes for at hindre eller vanskeliggøre begroning på skibsbunde.

1.1 Antibegroningsmidler

Tributyltin (TBT) er det mest effektive antibegroningsmiddel, som har været anvendt i ca. 20-25 år. Koncentrationen af TBT i alle indre danske farvande er 0,6-4,4 ng/l havvand. Ved koncentrationer på mindre end 1 ng/l havvand er der konstateret kønsforstyrrelser hos de mest følsomme snegle. Siden begyndelsen af 1990'erne har det været forbudt i EU, og mange andre lande, at bruge TBT-baseret bundmaling til mindre skibe. Forbudet er primært rettet mod lystbåde. Alternativer har været: kobberholdige bundmalinger, samt Irgarol og Diuron (Foverskov, S., et al, 1999).

"Generationssmålet" underskrevet af miljøministrene på den 4. Nordsø-konference er: "Udledningen af miljøskadelige stoffer skal nedbringes til nær nul for de menneskeskabte syntetiske stoffer og nær baggrundsværdien for de naturligt forekommende stoffer inden år 2020".

Biociddirektivet blev offentliggjort på EU-plan i april 1998. Ifølge det, skal alle nye biocider godkendes fra d. 14 maj 2000, bl.a. for øko-toksikologiske effekter. Eksisterende biocider skal igennem godkendelsesordningen indenfor en 10-årig periode. Der kan gå adskillige år, før biocider i bundmalingen bliver vurderet og godkendt på EU-plan. Bl.a. på denne baggrund har Danmark valgt, at indføre særregler for anvendelsen af antifouling maling til lystbåde (Foverskov, S., et al, 1999).

I Danmark har der ikke tidligere været krav om, at antibegroningsmidler skulle godkendes, inden de blev markedsført. En opstramning af lovgivningen vedr. biocidholdige bundmalinger kom i 1991, hvor forbud mod TBT-baserede malinger til skibe under 25 m så dagens lys. I 1999 blev der vedtaget en bekendtgørelse, som forbyder brugen af de mest miljøskadelige antibegroningsmidler til lystbåde. Dette indebærer at biociderne Diuron og Irgarol fra 1. januar 2000 hverken måtte sælges eller anvendes til fartøjer under 25 m. Det er ikke tilladt at sælge eller anvende biocidholdig maling til fritidsbåde, der overvejende sejler i ferskvand. Det er ikke tilladt at sælge eller anvende biocidholdig bundmaling til små fritidsbåde under 200 kg, medmindre de har fast kajplads i en havn eller er træbåde. Bekendtgørelsen blev i 2003 yderligere strammet og der er nu også fastsat restriktion for udludning af kobber. Fra 1. januar 2006 må der ikke anvendes biocidholdig bundmaling, som afgiver stoffer, der kan forårsage uønskede langtidsvirkninger i havmiljøet (Bekendtgørelse nr. 992 af 5. december 2002) (Foverskov, S., et al, 1999) (NERI, 2000).

Størstedelen af verdens skibe bliver malet oftere end hvert tredje år, derfor kan et globalt internationalt forbud mod anvendelsen af TBT-holdige bundmalinger have hurtige miljøeffekter (Foverskov, S., et al, 1999). Brugen af TBT-baseret bundmaling forsøgte i flere år reguleret internationalt via FN-organisationen IMO (International Maritime Organisation). De fleste internationale restriktioner kommer fra IMO's side. Forslag til at udarbejde en konvention om en total udfasning af TBT og andre organotinbaserede stoffer kom for relativ lang tid siden, men det totale forbud kunne ikke lade sig at virkeliggøre, uden at der først fandtes nogle effektive alternative malingsystemer på markedet. Derfor har det været vigtigt at udvikle nye effektive antifouling systemer hurtigst muligt. Målet var, at denne konvention skulle udarbejdes senest år 2001. Det seneste IMO møde, hvor TBT - problematikken igen blev lagt op til det endelige forbud mod TBT var i London den 1. og den 5. oktober 2001, hvor et totalt forbud mod påføring af

TBT-holdig bundmaling blev vedtaget fra 1. januar 2003, og forbud mod tilstedeværelsen af denne type bundmaling på skibe fra 1. januar 2008. Forpligtelserne gælder dog først fra IMO-konventionens ikrafttrædelse dvs. efter at et vist antal lande har ratificeret konventionen. I erkendelse heraf har EU vedtaget at følge udfasningsprogrammet uden at afvente at konventionen træder i kraft. 2003-forbudet gælder således allerede i EU og for EU-skibe.

Tilstedeværelsen skal forstås som eksponeret mod miljøet, da det er tilladt (og ønskeligt) at forsegle den gamle maling i stedet for at skrabe den af.

Et forbud mod anvendelsen af TBT- baserede malinger fra 2003 har også åbnet diskussion omkring at forbyde andre biocider i fremtiden. IMO har vedtaget at arbejde for at fremme brugen af mindre miljøskadelige antibegroningsmidler til den internationale skibsflåde, samtidig med at de mest giftige forbydes. Herunder er restriktioner mod anvendelsen af kobber blevet strammet. Nuværende lokale restriktioner er i de fleste lande rettet mod kystområder og små skibe (Foverskov, S., et al, 1999) (MER, Febr. 1997).

Tyske, norske, og svenske virksomheder har taget initiativet til at deltage i udviklingen af nye biocidfri alternativer under navnet: "Group 2003" (WWF Verdensnaturfonden, 2001).

2 Maling til antifouling

2.1 Alternative malingstyper

Alternative malingstyper kan opdeles i:

- de traditionelle malingstyper, som indeholder biocider, der nedbrydes relativt hurtigt til uskadelige nedbrydningsprodukter. Eksempler på disse malingstyper er produkter, der indeholder zinkpyrithion, som kan erstatte Diuron og Irgarol til lystbåde, eller Sea-nine, som kan bruges i et vist omfang som alternativ til TBT i bundmaling til store skibe.
- produkter med specifikke overfladeegenskaber (non-stik produkter / "low surface energy"). Disse produkter er nogle biocidfri alternativer, som stadig er under udvikling. Silikone- eller teflonbaserede malingssystemer har en glat overflade, og en lav overfladespænding. De egner sig i dag kun til hurtigtgående skibe. Epoxybaserede malinger har en hård overflade og en høj overfladetæthed.
- andre alternativer til traditionelle biocider, f.eks. naturligt forekommende organiske forbindelser som enzymer, kulhydrater etc.

2.1.1 Zink- og kobberpyrithion som de gode alternativer til TBT

De fleste alternative antifouling bundmalinger, der findes på markedet i dag, indeholder stort set alle sammen kobber som aktivt stof. Udover det indeholder de oftest et eller flere andre antibegroningsmidler (Foverskov, S., et al., 1999).

Pyrrithioner forventes at være de ideale alternativer til den giftige TBT p.g.a. følgende karakteristik:

- en bred antimikrobiel aktivitet
- lav vandopløselighed
- minimale økotoksikologiske risici pga. en relativt hurtig bio-nedbrydning til nogle mindre giftige stoffer, både i fersk- og saltvand (Turley A., P., et al, 2000).

2.1.2 "Low surface energy" produkter

Biox fra Kasai Paint, og Bioclean fra Chugoku er eksempler på "low surface energy" produkter, som er teflon- og silikonebaserede systemer, der allerede findes på markedet. Produkterne vurderes som effektive til skibe med høj hastighed. De største forhindringer ved en generel anvendelse af disse produkter ligger i nogle dårlige mekaniske egenskaber (se afsnit 2.2.1) og en høj pris i forhold til de traditionelle antifouling malinger, som er baseret på kobber. Flere producenter er i gang med en gennemførelse af pre-kommerciel afprøvning af nye "low surface energy" produkter (MER, febr. 1997).

Der er nogle mekaniske faktorer, som er vigtige for antifouling egenskaber af en maling baseret på polymermatrix (non-stik produkt):

- overfladespænding
- elastisk modul

- malingslagets tykkelse

En detaljeret undersøgelse af fase-interaktion mellem biofilm (fouling) og maling peger på, at en tyk maling med et lavt elastisk modul og lav overfladespænding viser den mindste modstand til fjernelse af begroning (Brady F., R., Singer L., I., 2000).

Non-stik antifouling egenskaber hos en silikonebaseret maling kan forbedres ved at tilføre "ikke-bundet" silikoneolie til malingens matrix.

Ideen blev praktisk afprøvet på 5 store skibe i Nord Amerika og på Hawaii. Sammenvoksning af "hård" og "blød" begroning på overflader af: en maling baseret på polydimethylsilikone (PDMS) matrix og en maling baseret på den samme matrix, men med en polydimetyldiphenylsilikone- (PDMDPS) olie - additiv, blev sammenlignet. PDMDPS olie nedsætter sammenvoksning af rurer og nogle arter østers .

Kun 1,1 vægt-% af den tilførte olie til matrix blev udludet fra malingen i løbet af et år, og giftighed af malingen viste sig minimal over for fisk og rejer.

I fremtiden skal man både arbejde på at udvikle "fouling-release" karakteristisk og malingens holdbarhed (Truby, K., et al, 2000).

2.1.3 Økotoksikologisk vurdering af nuværende alternativer

I Danmark blev en vurdering af forskellige malingstypers indflydelse på miljøet foretaget på baggrund af resultater af to selvstændige undersøgelser. I 1997-1998 blev en undersøgelse gennemført af CETOX (Center for Integreret Miljø og Toksikologi), der er et samarbejde mellem VKI (Vandkvalitetsinstituttet, nu DHI - Vand & Miljø) og DTC (Dansk Toksikologi Center), samt DMU (Danmarks Miljøundersøgelser). Rapporten indeholder en kortlægning og miljøvurdering af antibegroningsmidler til lystbåde, samt en status over daværende alternative metoder og alternative bundmalinger. Siden rapporten blev skrevet, er mange nye produkter dukket op på markedet, og mange er stadigvæk på udviklingsstadiet.

TBT, Diuron, Irganol, kobberforbindelser, zinkpyrithion, og Sea-nine blev testet. TBT, Diuron, Irganol og kobberforbindelser blev vurderet som meget giftige for vandlevende organismer (dog er giftigheden af kobber afhængig af en række fysisk-kemisk faktorer). Der konkluderes, at miljøvurdering af zinkpyrithion og Sea-nine kræver en mere omhyggelig gennemgang af de indsamlede tekniske data. På basis af den sundhedsmæssige vurdering bør f.eks. Sea-nine klassificeres som Xi (lokalirriterende) (Madsen, T., et al, 1998).

I 1998 blev en anden undersøgelse gennemført af J. C. Hempel's Skibsfarve-Fabrik A/S og VKI (nu DHI - Vand & Miljø) (Madsen, T., et al, 1999), (Madsen, T., et al, 2000). Denne undersøgelse var en del af projektet "Indledende vurdering af mekanisk rensning som alternativ til biocidholdig bundmaling samt vurdering af biocidholdige antibegroningsmidler med forventet reduceret miljøbelastning". Det samlede projekt var udført af Dansk Sejlunion, Hempel's Skibsfarve-Fabrik, og VKI for midler fra: Rådet for genanvendelse og mindre forurenende teknologi.

- Målet med den ovennævnte undersøgelse var økologiske vurderinger af kobber, Sea-Nine og zinkpyrithion, samt biocidfrie malinger (epoxy- og silikone-baserede). Undersøgelsens resultater er følgende:
- Kobber som evt. frigives fra de ikke - miljøfarlige organiske forbindelser til en fri form er meget farlige for miljøet.
- Der kan forventes giftige effekter af organiske biocider DTOI. (dichloroethylisothiazolin; Sea-Nine 211) og zinkpyrithion inde i en lystbådehavn, hvor et stort antal af lystbåde med bundmaling med det pågældende aktive stof befinder sig (kroniske effekter på alger, krebsdyr, og fisk). Udenfor lystbådehavnen er risikoen for giftige effekter lav (Madsen, T., et al, 2000).
- En epoxy-baseret og en eksperimental formulering med silikone var hhv. 1000 og 100 gange mindre giftige end en traditionel bundmaling baseret på organiske TBT- forbindelser. Der blev kun fundet effekter hos krebsdyr, hvis de blev udsat for ufortyndede vandprøver fra forsøget med epoxy-baseret maling. Derimod var der effekter overfor både alger og krebsdyr med fortyndede vandprøver fra forsøget med den silikoneholdige maling. Det skal afprøves, om disse effekter kan undgås, hvis man justerer produktionen af malingen, og/eller ændrer påføringsteknikken.

Konklusionen er, at aktivstofferne DTOI og zink- pyrithion nedbrydes hurtigt, og vil næppe blive ophobet i miljøet, som det er tilfældet for TBT- forbindelser. Stoffer, som udvaskes fra de biocidfrie bundmalinger, kan i visse tilfælde skade alger og krebsdyr. Samtidig blev der peget på behovet for at udvikle malinger uden biocider, der tåler mekanisk rensning, eller som er så glatte, at alger og dyr ikke sætter sig fast (Madsen, T., et al, 2000).

De forhold, der er afgørende for størrelsen af koncentrationen af biocider i vandmiljøet er bl.a.: antallet af lystbåde med den biocidholdige maling i et bestemt vandområde, mængden af biocider, der frigives fra malingen, bionedbrydning af biociderne til evt. mindre giftige stoffer, vandudskiftning mm. (Foverskov, S., et al, 1999).

2.1.4 Alternativer på naturligt forekommende organiske forbindelser

Efterhånden som kravene til at undgå brug af biocider er stigende, er der kommet en række forslag til alternative løsninger til bundmaling.

Et biocidfrit antifouling malingssystem, hvor et enzym / en enzymblanding anvendes som et antifouling aktivt stof, og en harpiksmatrix af naturlig forekomst som binder, er påvist effektivt, specielt for at reducere/ forhindre fasthæftning af rurer. Mindst et enzym fra følgende grupper kan anvendes: proteaser, hemicellulaser, cellulaser, lipolaser, og amylaser (Schneider, I. and, Allermann, K., 2001).

Et andet biocidfrit antifouling system, hvor et enzymesystem anvendes som antifoulant, er udviklet af Danisco. Enzymet er isoleret fra en marin organisme (Kragh, K., M., Poulsen, Horsmans, Ch., 2000).

Et enzymbaseret antifouling malingssystem indeholdende bentonit hævdes også at være effektivt (Bonaventura, C., et al., 1999).

Endvidere er et produkt, hvor et lag kulhydrater skal gøre overfladen meget vandholdig og dermed ikke attraktiv for begroning, under udvikling (Madsen, T., et al, 2000).

Capsaicin er et aktivt stof i dette antifouling system, som indeholder fint fordelt *capsaicin*, en naturharpiks baseret *capsaicin* opløsning, eller krystalliseret *capsaicin*. Dette kan blandes med silikone dioxide og bagefter opløses i et organisk opløsningsmiddel til en homogen *oleoresin*-opløsning.

Denne antifouling komposition kan anvendes i kombinationen med de traditionelle antifouling systemer og bindere der kan påføres på metal og polyester (Watts, James L., 1995).

2.1.5 Antifouling stoffer af naturens egne biocider

En anden mulighed er at bruge de naturlige biocider (metaboliter fra marine organismer) i stedet for TBT eller kobber (MER, febr. 1997).

Nuværende kommercielle antifouling løsninger omfatter produkter, som enten forebygger begroningen eller fremkalder frigivelse af begroningen fra overfladen (*foul-release* malingsystemer). Antifouling produkter har en bred biocid-spektrums virkning, og de dræber organismene pga. oxidation eller toksisk metal-ion påvirkning.

Dimetylsilikone polymere giver baggrund til *foul-release* malingsystemer, som bliver begroet, men hvor begroningen let falder af. De bedste af denne type malinger indeholder også additiver, som dræber organismene (Rittschof, D., 2000).

På grund af de toksiske virkninger af TBT-baserede malinger er der stor interesse for at finde, isolere, og kommercielt anvende antifouling komponenter som allerede findes i naturen. De naturlige begroingshæmmende stoffer kan være: toksiner, overfladeaktive stoffer, inhibitorer, o. lign.

Forskningen indenfor området er faktisk begyndt for 50 år siden. De forhindringer, som hæmmer udviklingen af denne type antifoulingssystemer er først og fremmest de høje omkostninger. Udover det skal der laves nye standarder, som passer til de naturlige biocid-baserede malingers udvikling (Rittschof, D., 2000).

En række bakterier bl.a. marine bakterier: *Pseudoalteromonas tunicata* som producerer antifouling stoffer, og *Escherichia coli* blev anvendt til at undersøge metoder for at mobilisere bakterierne i en ikke-toksisk gel-matrix.

Der blev afprøvet forskellige typer af matrix indholdende levende rur-larver. Den optimale matrix blev udvalgt som 10% polyvinylalkohol (PVOH)- gel. Gelen viste sig stabil i havvandet. Tilstedeværelse af aktive bakterieceller, som producerede anti-fouling stoffer i gelen blev observeret, og testet ved hjælp af CTC- farvestof, grøn fluorescens - protein (GFP). Gelen var resistent mod rur-larver i op til 2 uger. Tilsvarende studie med *E. coli* C600 viste, at den biologiske aktivitetsperiode kan forlænges til over 2 måneder.

Resultaterne viser, at bakterierne kan forblive immobiliserede i antifouling i en periode, som svarer til bestemte antifouling - og antibakterielle anvendelses behov (Holmstrom, C., et al, 2000).

2.1.6 Alternating Current Anti Fouling (ACAF)

Ocean Environmental Technologies (OET) specialiserer sig i udviklingen af "energy assisted" antifouling system. OET anser systemet for "miljøvenligt". Lavfrekvens akustik- eller elektrisk felt anvendes i kombinationen med nogle specielle slags malinger. Dette kaldes for Alternating Current Anti Fouling (ACAF). Ideen er at anvende isolations- og ledende (*konduktiv*) malinger i følgende rækkefølge:

- *insulating*
- *konduktiv*
- *insulating* maling
- elektrode

Rurlarver bliver dræbt og fjernet fra malingerens overflade ved hjælp af dette system. (MER, febr. 1997)

2.1.7 Mekaniske løsninger og andre mulige løsninger

En hård biocidfri maling kombineret med mekanisk rensning med børster eller højtryksrensning anses for en potential løsning for lystbåde, men alle mekaniske metoder har indtil videre givet nogle dårlige resultater pga. praktiske begrænsninger. Desuden egner denne løsningsmulighed sig kun til lystbåde (Foverskov, S., et al, 1999).

Det formodes, at den manglende succes med de mekaniske afrensingsmetoder skyldes, at f.eks. rur-larvens meget hurtige forvandling efter fasthæftning gør det umuligt at fjerne de fastsiddende rurer med børster, men at de må skrubes af.

Antifouling løsninger som en "sovepose" til lystbåde eller en "mekanisk malingstype", som danner et tæt lag af syntetiske fibre, er blevet afprøvet. Begge løsninger fungerer tilsyneladende ikke i praksis (Foverskov, S., et al, 1999).

2.2 Undersøgelse af kobbers frigivelseshastighed

Denne undersøgelse indgik i projektet: "Test af mekanisk rensning af skibsbunde og antibegroningsmidler med reduceret miljøbelastning". Projektet indgår i "Program for renere produkter", og blev udført af J. C. Hempel's Skibsfarve-Fabrik A/S og Dansk Sejlunion.

Resultaterne viser, at der findes alternativer til de hidtil anvendte biocider til bundmaling til lystbåde, som har de ønskede miljøegenskaber, og at disse biocider i kombination med kobber virker effektivt mod begroning.

Målet med projektet var at finde den lavest mulige frigivelse af kobber fra bundmaling til både, som stadig sikrer skibsbundenes beskyttelse mod begroning.

Metoden var en praktisk afprøvning af to udvalgte malinger med forskellige kobberfrigivelseshastighed på et større antal danske lystbåde i forskellige havne.

Der blev testet to malinger med forskellige kobberafgivelseshastighed:

- en maling, svarende til en kommerciel, med en normal kobberafgivelseshastighed, det vil sige en høj initial frigivelse, som efter ca. 20 dage falder til et konstant niveau
- en maling med en meget lav initial frigivelse, der dog stiger efter en lille periode, men som stadig har et lavere frigivelsesniveauet end ovennævnte maling.

Resultaterne viser, at maling med lav kobberfrigivelse er dårligere til at forhindre slimbelægninger end den først nævnt maling med den normale kobberfrigivelse. I få tilfælde blev mere fastsiddende begroning (brunalger og enkelte rurer) også observeret. På den anden side vil maling med den lave kobberfrigivelse medføre 50% mindre kobberafgivelse i den periode, hvor mange akvatiske organismer formeres. På den baggrund vil Dansk Sejlunion og hovedparten af sejlere kunne acceptere den maling, men som den absolutte minimumsgrænse for de begroningshindrede egenskaber en bundmaling må have (Nielsen, G., et al, 2001).

2.3 Erfaringer med "biocidfri" produkter til større skibe

"Performance of biocide-free antifouling paints" er en rapport, som beskriver gennemførelse, metode og resultater af en praktisk afprøvning af biocid-frie bundmalinger på dybhavssejlende skibe (Watermann, B., et al, 2001).

Undersøgelsen har været arrangeret af en tysk interessegruppe, som bestod af:

- projekt ansvarlig: WWF Tyskland
- relevante forskningslaboratorier, ministerier, skibsejere og
- store malingsproducenter

2.3.1 Baggrund for undersøgelsen

På grund af de aktuelle og fremtidige forbud mod anvendelsen af de fleste traditionelle biocidbaserede malinger, og på grund af de store restriktioner mod biocidproducerende farveproducenter på EU markedet (Biocidal Products Direktive, maj 2000) understreges det her i rapporten, at perspektivet i forskningen og udviklingen indenfor begroningshæmmende bundmalinger må ligge i:

- at undgå / eliminere anvendelse af udludningsbiocider, som udgør potentiel risiko for havmiljø (giftighed, bioakkumulering, resistens)
- ingen af komponenterne i en bundmaling må indeholde farlige stoffer
- antibegroningseffekten skal være høj, og vare i en lang periode (tilpasset til geografisk område, mikro- og makroflora, saltindholdet, vandets temperatur, skibsstørrelse og beskæftigelse mm.)

Der er ca. 40 større producenter af bundmaling i verden, som hævder, at de er i stand til at leve op til de høje krav til biocidfri malingsudvikling. Flere end 20 små producenter udvikler biocidfri antifouling strategier.

De fleste biocidfri malinger, som er på markedet i dag er:

- non-stik produkter: silikone eller teflonbaserede (silikone erstattes evt. med silikone lignede komponenter)
- mikrofiberbaseret "silky" overflade
- selvpolerende polymer - teknologi
- ablativ systemer (udludningssystemer)

(Watermann, B. et al, 2001, Keystones Inc., 2001)

2.3.2 Metode

Ikke-toksisk antifouling maling er afprøvet under almindelig marine praksis, herunder rensning af overflade, primer/grundmaling og anvendelse af allerede kendte påføringsteknikker på 19 forskellige dybhavsgående skibe. Undersøgelsen er to-periodisk: langtidsvirkning af antifouling maling er testet ved at undersøge de samme skibe, som blev malet i forbindelse med en tidligere undersøgelse.

De første skibe blev malet med testmalinger i 1998, og undersøgt efter 28-31 måneder (i slutningen af 2000).

Specielle kriterier til udvælgelse af skibe til påføring med de testede malinger blev anvendt.

Forskellige typer af biocidfri bundmalinger fra 13 deltagerproducenter blev anvendt.

Der blev afprøvet 27 biocidfri malinger (allerede eksisterede på markedet) på 80 forsøgsplader på skibe, eller ved fuld påføring på skibsbund:

- 13 non-stik produkter: 10 silikonebaserede malinger: polydimethylsiloxan (PDMS), 2 baserede på silikone-lignede antifoulingstoffer, 1 baseret på paraffin voks
- 2 mikrofiber baserede malinger (200 fibre på 1 og 1,2 mm /mmm²), første lag: epoxy lim
- 9 biocidfri selvpolerende malinger (mekanismen, som er kendt fra TBT eller selvpolerende hydrolysekontrolleret proces), copolymer af methylnmethacrylate og speciel designet epoxy som additiver
- 3 antikorrosive malinger: klorkautchuk, polyuretan, vinyl maling, ren højmolekylær epoxy

Biocidbaserede malinger blev også påført på deltagerskibe for at sammenligne antifoulingeffekten og varighed i forhold til de testede malinger. (Watermann, B., et al., 2001)

2.3.3 Resultater

Afrapportering skulle omfatte følgende elementer: beskrivelse af testpaneler, beregning af rur-sammenvoksning, identifikation af begroningssammensætning, tørstofbestemmelse af begroningen og evaluering af malingens tilstand

Det er konstateret at:

- De fleste af de testede malinger viste "meget god" eller "god" kvalitet.
- En mindre del af malingerne var dårlige eller skulle have været anvendt under andre meteorologiske forhold.
- Der er forskel på effektiviteten af silikonebaserede malinger på de forskellige skibe. Bl.a. er den afhængig af graden af skibets operative opgaver og skibets hastighed. Kun 1 af de silikonebaserede malinger, og 3 selvpolerende malinger viste gode antifouling resultater efter en

periode på 6-11 måneder. Andre malingers effektivitet falder med tiden. Silikone malings antifouling effekt er meget bedre på skibe med høj hastighed. En anden non-stik maling (ikke silikone-baseret) viste meget god effektivitet på skibe med høj hastighed.

- Effektiviteten af antifouling biocidfri maling er meget god i vinter-sæsonen (utrolig lav begroingsgrad).
- Selvpolerende malinger er bedre på skibe med høj hastighed i forhold til med lav hastighed. Der er problemer i forbindelse med ujævn udludning af aktive stoffer afhængigt af skrogets form.
- Microfibre-maling viste meget god effektivitet mod begroning med rurer, men dårlig mod makroalgebegroning.
(Watermann, B., et al., 2001)

2.4 Diskussion og konklusion

Der er en række forhold, som har indflydelse på effektiviteten/egnetheden af et bestemt antifouling system:

- skibets størrelse, operative opgaver og hastighed
- skrogets form
- vandets saltindhold og temperatur
- geografisk område (herunder begroningens sammensætning)
- sæson (sommer/vinter)
- økonomi mm.

En karakteristik af et godt alternativ:

- effektivitet: et bredt antifouling spektrum og en lang genmalingsperiode
- (relativ) lav giftighed
- egnet til konkrete anvendelsesbehov: skibsstørrelse, skibets hastighed, geografisk område (herunder fouling sammensætning, biofilmens tæthed, vandets temperatur og saltindhold mm.)
- lav bioakkumulation (i vandet, i sedimentet, og i fødekæden)
- lav vandopløselighed
- lav energi / lav overfladespænding
- lav pris
- forenelig med andre maling råvarer (dispersions system)
- kontrolleret udludningsrate / mekanisme
- gode fysisk / mekaniske egenskaber (f.eks.: en glat overflade)
- korrosionsbestandig

Et optimalt alternativ til antifouling systemet er endnu ikke fundet. Nuværende alternativer er ikke optimale hovedsagelig pga.:

- lav effektivitet
- høj pris

3 Råvarer til skibsbundmaling til lystbåde

Gennemgang af råvarekataloger, litteratur og kontakt med råvare leverandører viser at nedenstående råvarer vil være egnede til fremstilling af henholdsvis organisk opløsningsmiddelbaseret som vandfortyndbar antifouling maling.

3.1 Bindemidler

Naturharpikser har været brugt og bruges til antifouling produkter, men der opnås en bedre stabilitet ved at anvende hydrogenerede naturharpikser. Hydrogenerede naturharpikser er lyse og meget stabile mod oxidation. De er let klæbende og medvirker til at give en god vedhæftning til underlaget. Hydrogenerede naturharpikser er opløselige i både aromatiske og alifatiske kulbrinter.

Ikke tværbundne Polymethacrylater (PMA) er meget bestandige mod ældning og bruges i formuleringerne til at give forbedret vedhæftning, hårdhed og bedre slidbarhed. PMA er opløselig i alkoholer, aromatiske og alifatiske kulbrinter.

Selvpolerende bindemidler er typisk co-polymerer der har den egenskab at de er delvist opløselige (hydrolyserer) i vand. Dette medfører at malingslaget hele tiden fornyes.

Harpiksdispersioner der er lavet på basis af stabiliseret naturharpiksester, kan bruges til fremstilling af vandfortyndbare antifoulingssystemer. Dispersionerne er let klæbende hvilket øger vedhæftningen. De er anionisk ladede og har en god vandresistens.

Copolymere vinylacetat/akryldispersioner såvel som rene akryldispersioner kan bruges sammen med harpiksdispersion for at give fleksibilitet og styrke til antifoulingfilmen.

Polyurethanemulsioner kan være meget elastiske og flere typer med varierende fleksibilitet. Polyurethanemulsioner kræver i nogle tilfælde en tilsætning hexamethoxymethylmelamin (HMMM) for at forbedre vandfølsomheden og vedhæftningen til underlaget.

Epoxyasilaner giver glatte og vandafvisende overflader og bruges blandt andet for at lette rengøringen og for at give langtidsbeskyttelse mod tilsmudsning.

3.2 Opløsningsmidler

Aromatiske og alifatiske kulbrinter, alkoholer såvel som vand, bruges dels som opløsningsmidler til binderne, dels for at opnå den rigtige påføringsviskositet af produktet.

3.3 Pigmenter

Titandioxider er meget bestandige lysægte hvide dækkende pigmenter der bruges til at opnå lyse farvenuancer som grå, lys blå osv. Til prøverne er der brugt den "ikke kridtende type" rutil".

Jernoxyder er meget bestandige lysægte pigmenter der indeholder jern enten i iltningstrinnet 2 (ferro) eller 3 (ferri), de findes i forskellige rødbrune og okkergule nuancer samt i sort.

Organiske pigmenter bruges især hvis der skal opnås specialnuancer.

3.4 Fyldstoffer

Dolomit er en blanding af magnesium- og calciumoxid. Dolomit er inert, det har ikke dækkeevne som pigmenter, men bruges sammen med pigmenter for at give malingerne "fylde" det vil sige at opnå den rigtige pigmentvolumenkonzentration således at dækkeevne og påføringsegenskaber bliver optimale.

Talkum er en blanding af silicium- og magnesiumoxid. Talkum virker tixotropigivende på viskositeten, men er også medvirkende til at give en bedre slibbarhed.

3.5 Fortykningsmidler

Organisk modificeret bentonit og sepiolit kan bruges som tixotropigivende midler i produkterne.

3.6 Additiver

Polyether siloxaner bruges som antiskummidler for at fjerne den luft der kommer i produkterne under fremstillingsprocessen.

Dispergeringsmidler af typen alkylamoniums salt af henholdsvis en blok copolymer og en polyfunktional polymer vil blive brugt for at sikre den bedst mulige dispergering af pigmenter og fyldstoffer.

I vandfortyndbare produkter anvendes der konserveringsmiddel for at sikre lagerstabilitet.

Endelig er der behov for et antibegroningsmiddel der normalt ville være et biocid.

4 Udvalgelse af Enzymer

4.1 Hvad er et enzym?

Enzymer er en type proteinmolekyler opbygget af aminosyrer. Disse proteiner indgår i alle levende celler i mikroorganismer, planter, dyr og mennesker og er en nødvendig bestanddel i alt liv.

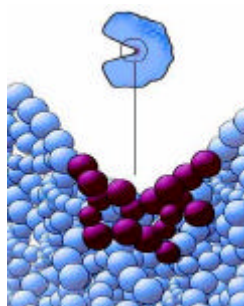
Når næringsstoffer i cellen skal omdannes er der enzymer involveret i processerne. Disse næringsstoffer omdannes til energi eller byggesten for cellen ved hjælp af enzymerne i cellerne.

Enzymer virker som biologiske katalysatorer dvs. de indgår i de biokemiske processer i cellerne uden selv at blive forbrugt. Enzymerne bliver derfor genbrugt af cellen.

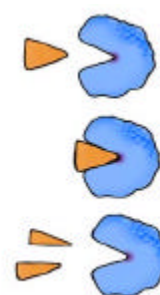
Der kendes i dag flere tusinde forskellige enzymer. Enzymer kan inddeles i seks hovedgrupper efter virkemåde. For en nærmere beskrivelse af hovedgrupperne se f.eks. ref. 1.

Hovedgrupperne er: oxidoreduktaser, transferaser, hydrolaser, lyaser, isomeraser og ligaser. Hver hovedgruppe har sine specielle funktionelle egenskaber. Enzymerne navngives efter de substrater de omsætter. Således omsætter proteaser proteinmolekyler til byggestenen aminosyre, mens glucosylaser vil virke på stivelse og danne glukose som produkt.

I det følgende beskrives enzymer med hydrolytiske egenskaber nærmere. Transformations processen af et substrat til et produkt i en celle kan beskrives ved en ligevægt. (se figur 1 og 2). Illustrationerne med enzymer er brugt med tilladelse fra Novozymes A/S.



Figur 1 Enzymets aktive del.



Figur 2, E + Substrat → Produkt + E

Omsætningsprocessen i en celle af et substrat ved hjælp af et enzym vises i figur 2. Substratet der f.eks. er blevet optaget af cellen omsættes til produkt efter den viste ligevægt. Cellen kan så udnytte produktet til at lave nye byggesten for vækst eller energi.

Enzymer kan også forekomme ekstracellulært, hvor de udskilles aktivt af cellen med det formål at f.eks. nedbryde komplekse organiske forbindelser, som

cellen ikke kan optage før de er nedbrudt til mindre organiske molekyler. Det er især mikroorganismer, som udskiller enzymer til sine omgivelser, og enzymer udskilles derfor på naturlig vis til miljøet, men de nedbrydes meget hurtigt af andre organismer. Denne evne hos mikroorganismer til at udskille enzymer udnyttes til industriel fremstilling af enzymer (White, A, et. al. 1973).

4.2 Fremstilling af enzymer

Fremstilling af enzymer til industriel anvendelse foregår ofte ved at dyrke bestemte udvalgte mikroorganismer. Disse mikroorganismer er udvalgt fordi de har nogle enzymer som kan omsætte et substrat til et givet produkt, som man industrielt måtte være interesseret i.

En forenklet fremstillingsproces af et industrielt enzym kan beskrives som følger:

- Mikroorganismene dyrkes i store beholdere – såkaldte fermentorer - under kontrollerede pH, ilt og temperaturbetingelser.
- Tilsat den rette næring vil mikroorganismene vokse og udskille enzymmolekyler til det omgivne vandige miljø under ét kaldet kulturvæske. Processen kan sammenlignes med en gæringsproces til f.eks. fremstilling af vin.
- Efter endt dyrkning filtreres selve mikroorganismen fra kulturvæsken. Denne væske, der nu ikke mere indeholder mikroorganismen, kan nu oprensnes yderligere.

Oprensningen kan foregå ved en opkoncentrering af kulturvæsken ved inddampning, udsaltning eller f.eks. ultrafiltrering. Dette foretages for at opnå et mere aktivt præparat, afhængig af enzym samt anvendelsen af enzymet.

Endelig kan præparatet spray-tørres for at få enzymet på pulverform, eller præparatet kan stabiliseres på forskellig vis, hvis enzymet ønskes opbevaret på væskeform.

4.3 Anvendelse af enzymer

Det er ofte enzymer med hydrolytiske egenskaber der er interessante i en industriel sammenhæng. Disse hydrolytiske enzymer indgår i mange kendte processer i dagligdagen.

Der anvendes f.eks. enzymer i opvaskemidler og vaskepulver hvor disse enzymmolekyler nedbryder og dermed frigiver snavset (æg, blod m.m.), og hvor de snavsede partikler så fjernes fra f.eks. tøj i vaskeprocessen.

Anvendelse af enzymer finder også sted i fødevarerindustrien, f.eks. fremstilling af brød, vin, øl, eller fremstilling af sødestoffer ud fra stivelse ved hjælp af enzymer (www.novozymes.com).

Fremstilling af ethanol ud fra biomasse hvor den dannede ethanol så anvendes i benzinen, er et andet eksempel på anvendelse af enzymer (www.genencor.com).

Enzymer anvendes således til fremstilling af en lang række produkter som indgår i vores dagligdag.

4.4 Anvendelse af enzymer i skibsmaling

Anvendelse af enzymer i skibsmaling er endnu ikke kendt i praksis. På verdensplan er der udtaget relativt få patenter på området som beskriver anvendelse af enzymer som anti-begronings middel.

Anvendelsen af enzymer som anti-begronings middel kan principielt opdeles i to. Indirekte – eller direkte anvendelse.

Den indirekte anvendelse af enzymernes funktion er at omdanne substratet til et produkt. Både enzym og substrat tænkes inkorporeret i skibsmalingen. Produktet som dannes ved den enzymatiske reaktion i malingen eller på dennes overflade, vil så udgøre det egentlige anti-begronings middel i skibsmalingen (Kragh, K., M., Poulsen, Horsmans, Ch., 2000).

Den direkte anvendelse af enzymer er brugen af enzymer til hydrolyse af de klæbestoffer som organismene udskiller for at hæfte sig fast til overfladen. (Schneider og Allermann, 2000)

4.5 Udvælgelse af enzymer

Ved valg af enzym eller enzystem i den direkte anvendelse af enzymer i skibsmalinger skal der fokuseres på de "klæbestoffer" som organismene udskiller for at fasthæfte sig.

En vigtig gruppe af marine organismer som signifikant bidrager til fouling processen er den gruppe af crustaceer, som med en samlet betegnelse kaldes rurer.

Disse organismer hører til subklassen Cirripedia og ordnen Crustacea. En fællesnævner for Cirripedia er, at det voksne stadium er fastsiddende på overflader og fjerner sig ikke fra dette sted resten af sin levetid.

Denne fasthæftning forekommer ved at larven - den såkaldte cyprid - svømmer rundt, indtil den finder en overflade, som den kan sætte sig på. Overfladen undersøges nærmere inden larven sætter sig.

Fasthæftningen foregår ved at larven udskiller et klæbestof som udskilles fra første antenne hos larven. Når klæbestoffet er udskilt størkner denne. Larven er nu immobiliseret og undergår en forvandling – metamorfose – til det voksne stadium. Den voksne rur kan nu kun fjernes fra fasthæftningsstedet ved en mekanisk påvirkning.

De klæbestoffer, som marine organismer anvender til at fasthæfte sig med, er undersøgt nærmere i forskellige laboratorier verden over. For rurerne gælder at hovedkomponenten i klæbestofferne er protein.

Valget af enzymer til den direkte anvendelse er således baseret på en (biologisk) forståelse af hvilke forbindelser der indgår i klæbestofferne og hvilke enzymer der naturligt kan nedbryde/hydrolysere disse klæbestoffer.

4.5.1 Enzymers evne til at nedbryde cypriders klæbestoffer

I 1994 er der foretaget undersøgelser hos TNO i Holland der skulle vise om dette biologiske tiltag med hydrolyse af klæbestofferne konceptuelt kunne holde.

Undersøgelserne hos TNO med tre forskellige proteaser viste at det kommercielle enzym Alcalase er i stand til at hindre 100% fasthæftning af cyprider ved en koncentration på 50 - 1000 ug/ml på testplader. Der blev endvidere udført forsøg med højere proteaseaktivitet, hvor også proteasens indvirkning på cypridernes tilstand blev vurderet. Se bilag A.

4.5.2 Forsøg med enzymer og bindemidler

Baseret på ovenstående eksperimenter blev Alcalase valgt som kandidat for yderligere undersøgelser. Alcalasen blev testet for kompatibilitet med 7 forskellige bindere som sædvanligvis anvendes i marine malinger ved at teste rest enzym aktiviteten efter 24 timer inkubation ved 36 ° C.

De 7 forskellige bindere var: modificeret harpiks, hydrogeneret harpiks, polyvinyl acetate emulsion, polyvinyl methyl ether, polyvinyl klorid copolymer, acrylic harpiks copolymer og silicone binder.

Alcalase blev tilsat og blandet med de ovenfor nævnte bindere ved 4 forskellige enzym koncentrationer (0.25%, 0.50%, 1.0%, and 2%, vægtprocent). De tilsatte mængder enzym blev baseret på tørstofindholdet i binderne.

Konklusionen fra forsøget var at Alcalase aktiviteten er påvirket af bindertypen. enzymaktivitet var tilstede, når denne var sammenblandet med modificeret og hydrogeneret harpiks (rosin), men der kunne ikke konstateres enzymaktivitet ved acryl, silicone samt nogle af polyvinyl bindere.

Det er dog ikke ensbetydende med at enzymer ikke vil kunne virke sammen med disse bindere. Det har blot under de givne forsøgsbetingelser ikke været muligt at detektere enzym aktivitet, sandsynligvis fordi disse bindere giver en meget lukket overfladestruktur. Se bilag B.

4.5.3 Indledende feltforsøg

På baggrund af binderforsøgene planlagdes feltforsøg i havvand for at undersøge effektiviteten af forsøgsmalinger indeholdende Alcalase i kombination med to andre kommercielle enzymprodukter en amyloglucosidase og et xylanase produkt.

To typer af forsøgsmaling indeholdende enzymer blev fremstillet. Malingerne blev benævnt BioB and BioS afhængig af om den var solventbaseret (BioB) eller vandfortyndbar (BioS).

Sandblæste akryl plader malet med de to marine malinger blev monteret på en ramme med 5 x 3 paneler pr. ramme. Rammerne blev nedsænket i havvand i to forskellige havne i Danmark (Jyllinge havn med stillestående vand og Helsingør lystbådehavn med høj vandudskiftning) i 6 måneder år 2000. Rammerne blev placeret på en sådan måde at den øvre del af rammen var ca. 1 meter under havoverfladen.

Evalueringen af disse feltforsøg viste at paneler med BioB indeholdende enzym var kun begroet med få rurer sammenlignet med BioB paneler uden enzym. Det kunne derfor konkluderes at kombinationen af BioB med enzymerne Alcalase og AMG signifikant reducerede fasthæftningen af rurer (sammenlignet med BioB som ikke indeholdt enzym. De to reference prøver indeholdt begge biociderne Irgarol og Diuron, biocider der i dag er forbudte til anvendelse i marine malinger i Skandinavien.

Med hensyn til floraen på panelerne havde BioB panelerne med enzym kun få typer af alger fasthæftet med kisel algen *Schizonema* som den dominerende, mens kontrol pladerne var fuldstændig overgroet med forskellige typer af alger. Alge foulingen på BioB pladerne med enzym var lette at rengøre idet begroingen let kunne fjernes med en fugtig svamp. Det kan derfor konkluderes at brugen af Alcalase i kombination med AMG/Pulzyme signifikant reducerer mængden af algebegroning.

Overfladerne af paneler malet med BioB var stadig fuldt intakte efter 6 måneder i havvand. Derimod viste BioS panelerne nogle revner og huller hvor der kunne detekteres begroning. Disse forsøg er mere udførligt beskrevet i bilag B.

4.6 Er enzymer biocider?

Et biocidmiddel er et bekæmpelsesmiddel, der ad kemisk eller biologisk vej ødelægger eller uskadeliggør skadelige organismer eller hindrer virkningen af skadelige organismer (www.mst.dk).

På biocidområdet har EU vedtaget et direktiv, som betyder, at medlemslandene skal indføre fælles regler for vurdering og godkendelse af produkter der indeholder biocider.

De aktive stoffer i biocidprodukter skal godkendes i EU, mens selve produktet godkendes nationalt. I EU's regler er det et væsentligt element, at biocidaktivstoffer ikke kan komme på direktivets positivliste hvis der findes andre stoffer eller metoder, som er tilstrækkeligt effektive og samtidig mindre farlige for sundhed og miljø (www.mst.dk).

Anti-fouling midler er beskrevet i direktivet under hovedgruppe 4, afsnit 21: "Antifoulingsmidler".

EU's biocid direktiv har følgende definition på et biocid:

"Aktive stoffer og præparater, som indeholder et eller flere aktive stoffer i den form, hvori de overdrages til brugeren, og som er bestemt til at kunne ødelægge, hindre, uskadeliggøre, hindre virkning af eller på anden vis bekæmpe virkningen af skadegørere kemisk eller biologisk" (EU-direktiv 98/8/EF, 16 Feb. 1998).

Enzymer er som tidligere nævnt en naturlig og nødvendig del for alt liv.

Som beskrevet ovenfor er anvendelse af enzymer i skibsmaling tænkt anvendt på to måder. I den indirekte anvendelse vil enzymerne danne et produkt i skibsmalingen og det er dette produkt der skal tages stilling til om det vil være omfattet af EU biocid direktivets definition.

I den direkte anvendelse af enzymer i skibsmalingen er det ved forsøg understøttet at enzymerne hydrolyserer det klæbestof som f.eks. en rur larve

afgiver for at fasthæfte på en overflade og ikke påvirker larven toksikologisk (TNO-report, 1994)

4.7 Ophobes enzymer i naturen?

Enzymproteinerne er vandopløselige molekyler samt bio-nedbrydelige. De omsættes derfor i naturen af bakterier og svampe til aminosyrer. Disse aminosyrer optages af mikroorganismene og omsættes således i økosystemerne til kuldioxid og vand. På det grundlag er det usandsynligt at enzymer kan ophobes i naturen.

4.8 Human toksikologi

Det er kendt at enzymer som alle andre proteiner i naturen i koncentreret form kan give både allergiske reaktioner, og hud, øje eller svælg irritationer.

De allergiske reaktioner adskiller sig ikke fra allergi fremkaldt af græs - eller birke pollen.

EINECS kataloget over kemikalier i EU indeholder mere end 100.000 forbindelser hvoraf mere end 300 er enzymer.

F.eks. er enzymet Alcalase klassificeret i Chemical Abstract Service Registry som en subtilisin, CAS no. 9014-01-1. Det tilsvarende Enzyme Classification no. (International Union of Biochemistry) er EC 3.4.21.62.

Enzymer klassificeres generelt på de færdige produkter med mærkningen Xn og risikovurderingen R42 "Kan forårsage sensibilisering ved inhalation".

Dette gælder for non-proteaser og andre proteaser end subtilisinerne, f.eks. Alcalase. Dette protease produkt vil derfor skulle mærkes med Xn (harmfuld), R36 (øje irriterende), R38 (hud irriterende) samt R42 (kan forårsage sensibilisering ved inhalation).

Denne beskrivelse af mærkning vil gælde for de færdige enzymprodukter afsendt fra en enzym producent. Denne mærkning er imidlertid uden betydning, når først enzymet er indlejret i en matrix, som finder sted i færdige enzymprodukter.

I forbindelse med inkorporeringen af enzymer i en skibsmaling vil enzymerne således være bundet til f.eks. en harpiks på samme måde som vi kender det fra et vaskepulver, hvor enzymerne er indstøbt i en voks.

Koncentrationen af enzym i malingen vil endvidere være så lav i det færdige malingsprodukt, at allergiske reaktioner hos slutbruger er usandsynlige.

5 Øko-toksikologi – enzymer

5.1 Indledning

Dette kapitel beskriver de øko-toksikologiske undersøgelser der blev udført på udvalgte enzymer anvendt i prototypemalinger. De øko-toksikologiske undersøgelser blev udført af DHI – Institut for Vand og Miljø. I henhold til den planlagte anvendelse af enzymerne i bundmaling til lystbåde eller større skibe blev der udført undersøgelser af bionedbrydelighed af enzymerne i havvand samt effekter overfor vandlevende organismer i både havvand og ferskvand.

5.2 Oprindelig teststrategi

Der er i projektets tidlige fase blevet udviklet prototypemalinger indeholdende en enzymblanding, som har vist sig at hæmme fasthæftning af marine organismer samt algevækst på prøvepaneler udsat i lystbådehavne. Af projektoplægget fremgår det at den anvendte enzymblanding skulle undersøges for bionedbrydelighed samt akutte og kroniske effekter i vandmiljøet hos alger, krebsdyr og fisk i henhold til følgende test:

- Bionedbrydelighed i havvand
- Væksthæmningstest med den marine mikroalge *Skeletonema costatum* (72 t.)
- Akut (48 t. mortalitet) og kronisk (21 d. livscyklustest) toksicitet med det marine krebsdyr *Acartia tonsa*
- Akut (48 t. immobilisering) og kronisk (21 d. reproduktionstest) toksicitet med det ferskvandslevende krebsdyr *Daphnia magna*
- Akut (10 d. mortalitet) toksicitet med det sedimentlevende krebsdyr *Corophium volutator*
- Akut (96 t. mortalitet) og kronisk (32 d. livscyklustest) toksicitet med den ferskvandslevende fisk *Danio rerio*

5.3 Revideret teststrategi

I vinteren 2001/2002 blev der foretaget en række indledende undersøgelser af enzymblandingen. Idet enzymerne angriber hinanden indbyrdes og hurtigt nedbrydes i vand blev det prioriteret at ændre teststrategien således at enzymerne blev testet både enkeltvis og i blanding for at kunne adskille eventuelle giftige effekter af et eller flere af enzymerne. Den hurtige nedbrydning af enzymerne medførte tillige at testkoncentrationerne ikke kunne opretholdes i kronisk test med *Acartia tonsa* samt akut test med *Corophium volutator*. Begge disse test udføres som længerevarende, statiske test (uden mulighed for fornyelse af testopløsninger) og er derfor uegnede til meget hurtigt nedbrydelige stoffer. Dertil kommer at sediment testen med *Corophium volutator* ikke er praktisk mulig at gennemføre med vandopløselige stoffer der ikke kan binde sig i sedimentet.

I lyset af de indledende undersøgelser blev en ny teststrategi fastlagt således at de enkelte enzymer blev testet for bionedbrydelighed og de enkelte enzymer

såvel som enzymblandingen blev testet for akutte effekter i henhold til følgende test:

- Bionedbrydelighed i havvand
- Væksthæmningstest med den marine mikroalge *Skeletonema costatum* (72 t.)
- Akut (48 t. immobilisering) toksicitet med det ferskvandslevende krebsdyr *Daphnia magna*
- Akut (96 t. mortalitet) toksicitet med den ferskvandslevende fisk *Danio rerio*

Ovenstående test blev udført i perioden maj-oktober 2002.

6 Øko-toksikologiske undersøgelser

6.1 Testprogram

De øko-toksikologiske test blev udført som GLP studier i overensstemmelse med de nedenfor angivne standarder og guidelines:

- Bionedbrydelighed i havvand /1/
- Væksthæmningstest med den marine mikroalge *Skeletonema costatum* /2,3/
- Akut toksicitetstest med det ferskvandslevende krebsdyr *Daphnia magna* /4,5/
- Akut toksicitetstest med den ferskvandslevende fisk *Danio rerio* /6,7/

6.2 Enzymer

Opløsninger af hver af de tre enzymer AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX samt Pulpzyme[®]HC blev fremsendt til DHI den 12. november 2001 af BioLocus. Opløsningerne blev opbevaret ved 4°C indtil teststart. Enzymopløsningernes karakteristika fremgår af tabel 6.1.

Tabel 6.1
Enzymer anvendt i økotoksikologiske undersøgelser.

Navn	Enzym	Udseende	Konservingsmidler og andre indholdsstoffer
AMG 300 L	Glucoamylase	Klar brun væske	Kalium sorbat, natrium benzoat, sucrose/glucose
Alcalase 2,5, Type DX	Protease	Klar gulbrun væske	MPG, sorbitol, calcium, formiate
Pulpzyme [®] HC	Xylanase	Mørk brun væske	Ingen data

Enzymerne blev testet separat i test for bionedbrydelighed og akut toksicitet overfor alger, krebsdyr og fisk. En blanding af de tre enzymer blev testet i forholdet 1:1:1 (vægtbasis) for akut toksicitet overfor alger, krebsdyr og fisk.

6.3 Testmetoder

6.3.1 Bionedbrydelighed i havvand

Bionedbrydeligheden af de tre enzymer i havvand blev undersøgt i henhold til OECD Guideline 306 /1/ med den modifikation at der blev anvendt et automatiseret respirometer, hvor iltoptagelsen ved mikrobiel aktivitet kan bestemmes med stor nøjagtighed. Respirometret omfatter 20 individuelle testflasker, hvor ilt og trykforholdene holdes konstant. Mikroorganismene anvender ilt til at omdanne teststoffernes kulstof til CO₂, som absorberes i en fælde indeholdende KOH. Det resulterende trykfald registreres kontinuerligt og udløser en elektrolytisk dannelse af ilt, som tilføres den enkelte testflaske.

Som inokulum anvendtes naturligt havvand med en salinitet på 32,4‰. Havvandet blev stabiliseret under svag beluftning i ca. en uge inden teststart. Havvandet blev grovfiltreret inden teststart.

Bionedbrydeligheden af hver af de tre enzymer blev testet ved en koncentration 20 mg/l. Testen blev udført i flasker indeholdende 900 ml testopløsning. Respirometret var termostateret til 22°C. Inkuberingen blev udført i mørke over en periode på 28 dage.

For at teste systemets følsomhed blev der tillige udført bionedbrydelighedstest med referencestoffet natriumbenzoat. Som kontrol for eventuel toksicitet af enzymerne blev der udført toksicitetskontrol i flasker inokuleret med både test- og referencestof.

Nedbrydningen af teststoffet beregnes som det biologiske iltforbrug (BOD) i % af det teoretiske iltforbrug ved fuldstændig mineralisering af teststoffet (ThOD):

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD}(\text{test} - \text{blind})}{\text{ThOD}} \cdot 100\%$$

Det teoretiske iltforbrug blev estimeret ved måling af enzymernes kemiske iltforbrug (COD).

6.3.2 Væksthæmningstest med mikroalgen *Skeletonema costatum*

Enzymernes toksicitet blev undersøgt i en 72 timers væksthæmningstest med den marine mikroalge *Skeletonema costatum* (NIVA BAC 1), som holdes i kultur på DHI. Væksthæmningstesten strækker sig over flere generationer af alger og kan derfor betragtes som en kronisk test. Ved undersøgelsen registreres biomassen dagligt i kulturer af alger, der vokser i en fortyndingsserie af teststoffet. Væksttest blev udført på fortyndingsrækker af stamopløsninger (1000 mg/l) af de enkelte enzymer samt på enzymblandingen i vækstmedium ved 28‰ salinitet, pH 8,0 og 19°C. Enzymerne blev testet i følgende koncentrationer: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 og 100 mg/l.

Væksttest blev udført i 250 ml kolber med 100 ml testopløsning. Algernes vækstrate og biomasse tilvækst blev beregnet på grundlag af daglige målinger af biomassen som in vivo fluorescens. Hæmningen af væksten i kolber med teststof blev beregnet i forhold til kontrolflasker uden teststof og udtrykt som funktion af koncentrationen i prøven. De koncentrationer der hæmmede væksten henholdsvis 10% og 50% blev udtrykt som EC10 og EC50 (hhv. EC10_r og EC50_r for hæmning af vækstraten og EC10_b og EC50_b for hæmning af biomasse tilvæksten). EC10 og EC50 værdier blev beregnet ved hjælp af statistik programmet TOXEDO /8/. Den højeste testkoncentration uden signifikant effekt (No Observed Effect Concentration, NOEC) samt den laveste koncentration med signifikant effekt (Lowest Observed Effect Concentration) blev beregnet ved hjælp af Dunnett's procedure /9/.

Som kontrol af algernes følsomhed blev der tillige foretaget test for toksiciteten af referencestoffet 3,5-dichlorphenol.

6.3.3 Akut toksicitetstest med krebsdyret *Daphnia magna*

Enzymernes akutte toksicitet blev undersøgt overfor det ferskvandslevende krebsdyr *Daphnia magna*. En stamme af *Daphnia magna* oprindeligt isoleret fra Langedam, Birkerød er blevet holdt i kultur på DHI siden 1979, og dyr fra denne kultur blev anvendt i test. Akutttest blev gennemført på fortyndinger af stamopløsninger af de enkelte enzymer samt enzymblandingen (1000 mg/l). Enzymerne blev testet i følgende koncentrationer: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 og 100 mg/l.

Akutttest blev udført som en statisk test i 18 ml testglas med 10 ml testopløsning. Akutttest blev udført i mørke ved 20°C. Der blev anvendt 20 dyr for hver koncentration (4 replikater à 5 dyr) og 30 dyr som kontrol. Der blev anvendt dyr der var mindre end 24 timer gamle. Iltindhold og pH blev målt ved start og afslutning af test. Antallet af immobile dyr blev registreret ved teststart, efter 24 timer og efter 48 timer ved testens afslutning. På baggrund af det registrerede antal immobile dyr efter 48 timer, blev de koncentrationer der forårsagede henholdsvis 10% og 50% immobilisering (EC10 og EC50) beregnet ved Probit analyse /10/.

Ved beregning af EC værdierne skal det verificeres at testkoncentrationerne har været opretholdt på et niveau svarende til mindst 80% af den nominelle koncentration. Alternativt skal EC værdierne baseres på målte koncentrationer. Som kontrol af testkoncentrationerne blev der foretaget analyser af total organisk kulstof (Non Volatile Organic Carbon, NVOC) /11/ i den højest testede koncentration (100 mg/l) til tiden 0, 24 og 48 timer. Udfra NVOC analyserne blev den akutte testkoncentration estimeret.

Som kontrol af dyrenes følsomhed blev der tillige foretaget test for toksiciteten af referencestoffet kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$).

6.3.4 Akut toksicitetstest med zebrafisk (*Danio rerio*)

Enzymernes akutte toksicitet overfor zebrafisk (*Danio rerio*) blev bestemt som den akutte dødelighed i en semistatisk test over 96 timer. Akutttest blev gennemført på fortyndinger af stamopløsninger af de enkelte enzymer samt enzymblandingen (1000 mg/l). Enzymerne blev testet i følgende koncentrationer: 1; 3; 10; 30 og 100 mg/l.

Zebrafisk blev indkøbt hos en lokal forhandler og blev efter modtagelsen på DHI akklimatiseret i 12 dage under forhold svarende til testbetingelserne. Under akklimatiseringen blev fiskene fodret dagligt indtil 24 timer før test start. Akutttest blev udført i polyethylen akvarier med 5 liter testopløsning og 10 fisk i hvert akvarium således at 10 dyr blev eksponeret for hver testkoncentration samt kontrol. Testopløsningerne blev fornyet med 24 timers mellemrum for at opretholde testkoncentrationen inden for 80% af den nominelle koncentration. Akutttest blev udført ved 23°C og en lys/mørke cyklus på 14/10 timer.

I løbet af testen blev antallet af døde fisk, svømmeadfærd, pigmentering og respiration registreret hver 24. time. De koncentrationer der forårsagede henholdsvis 10%, 50% og 90% dødelighed (LC10, LC50 og LC90) blev beregnet ved Probit analyse /9/.

Ved beregning af LC værdierne skal det verificeres at testkoncentrationerne har været opretholdt på et niveau svarende til mindst 80% af den nominelle

koncentration. Alternativt skal LC værdierne baseres på målte koncentrationer. Som kontrol af testkoncentrationerne blev der foretaget NVOC analyser /11/ af den højst testede koncentration (100 mg/l) til tiden 0 og 24 timer svarende til intervallet mellem hvert vandskift. Udfra NVOC analyserne blev den akutte testkoncentration estimeret.

Som kontrol af dyrenes følsomhed blev der tillige foretaget test for toksiciteten af referencestoffet kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$).

6.4 Testresultater

6.4.1 Bionedbrydelighed i havvand.

Primærdata fra testene fremgår af GLP test rapporter /12-14/.

Hver af de tre enzymer blev nedbrudt fuldstændigt i havvand i løbet af 28 dage (tabel 6.2). Ingen af enzymerne havde toksiske effekter på bakterierne i havvandet idet iltforbruget i toksicitets kontrollerne var i overensstemmelse med det summerede iltforbrug i flasker med henholdsvis enzymer og referencestof.

Tabel 6.2

Nedbrydning af AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC i havvand (OECD 306) i % af det teoretiske iltforbrug.

Dage	AMG 300 L (%)	Alcalase 2,5 L, Type DX (%)	Pulpzyme® HC (%)
7	91	102	96
14	102	111	109
21	105	116	116
28	105	120	122

For både Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC opnås en nedbrydning der overstiger 100% i løbet af testperioden. Dette kan muligvis skyldes at bakteriernes respiration (iltforbrug) blev forøget pga. stress-faktorer som følge af den hurtige fjernelse af kulstofkilder i testflaskerne.

Undersøgelserne opfylder de af OECD opstillede validitetskriterier /1/:

- Resultatet for referencestoffet natriumbenzoat var i overensstemmelse med kriterierne beskrevet i OECD Guideline 306
- Ingen af teststofferne medførte hæmning af mikroorganismene
- Mulige effekter af nitrifikation af kvælstofholdige komponenter blev taget i betragtning

I henhold til validitetskriterierne må respirationen i kontrolflaskerne ikke overstige 30% af iltforbruget i testflaskerne. Dette validitetskriterie var ikke overholdt i slutningen af de tre testforløb, men var dog overholdt i den periode hvor den overvejende nedbrydning af enzymerne fandt sted (87-100% nedbrydning). At forholdet mellem respiration i kontrolflasker og testflasker ikke opfylder validitetskravet i perioden efter at teststofferne har opnået næsten 100% nedbrydning vurderes ikke at have betydning for resultatet.

6.4.2 Væksthæmningstest med mikroalgen *Skeletonema costatum*

Primærdata fra testene fremgår af GLP testrapporterne /15-18/.

Alcalase 2,5 L, Type DX samt blandingen af de tre enzymer viste en hæmmende effekt på væksten af alger. AMG 300 L samt Pulpzyme®HC medførte ingen effekter på algevæksten i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer), hvorfor EC værdier ikke kunne beregnes for disse enzymopløsninger.

NOEC og EC50 værdier for hæmning af vækstraten som følge af test med de tre enzymer samt blandingen fremgår af tabel 6.3.

Tabel 6.3
Resultater af væksthæmningstest med *Skeletonema costatum*
(nominelle koncentrationer)

	AMG 300 L mg/l	Alcalase 2,5 L, Type DX mg/l	Pulpzyme® HC mg/l	Blanding mg/l
NOEC	≥100	5	≥100	10
EC50	-	17	-	45

Det fremgår af EC50 værdierne for Alcalase 2,5 L, Type DX og blandingen af de tre enzymer at Alcalase 2,5 L, Type DX var ca. 3 gange mere toksisk end enzymblandingen. Da de tre enzymer hver indgår med 33% i blandingen fremgår det, at blandingens toksicitet alene skyldes toksiciteten af Alcalase 2,5 L, Type DX.

Undersøgelserne opfylder de i metoderne specificerede validitetskriterier /2,3/:

- Celledensiteten i kontrolglassene er forøget med en faktor >16 i løbet af testperioden
- Variationen i pH værdien i kontrolglassene er < 1 fra start til slut

Resultaterne fra testen med referencestoffet 3,5-dichlorphenol viste en EC50 værdi for hæmning af vækstraten på 1,4 (1,3-1,4) mg/l, hvilket er i overensstemmelse med resultater opnået i en international ringtest (EC50 = 1,6±0,3).

6.4.3 Akut toksicitetstest med krebsdyret *Daphnia magna*

Primærdata fra testene fremgår af GLP test rapporter /19-22/.

Ingen af de tre enzymer medførte akutte effekter overfor *Daphnia magna* i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer), hvorfor EC værdier ikke kunne beregnes. De estimerede NOEC værdier for de nominelle og målte koncentrationer af enzymerne fremgår af tabel 6.4. De målte koncentrationer blev beregnet på baggrund af NVOC analyser.

Tabel 6.4
Resultater af akutttest med *Daphnia magna*, baseret på nominelle og aktuelle, estimerede testkoncentrationer.

	NOEC, nominal konc., mg/l	NOEC, målt konc*., mg/l
AMG 300 L	≥100	≥75
Alcalase 2,5 L, Type DX	≥100	≥100
Pulpzyme® HC	≥100	≥100
Blanding	≥100	≥85

* Beregnet på baggrund af den gennemsnitlige NVOC værdi i intervallet 0-48 timer

Resultaterne fra testen med referencestoffet kaliumdikromat viste en LC50 værdi på 1,26 (1,12-1,43) mg/l

Undersøgelserne opfylder de i metoderne specificerede validitetskriterier /4,5/:

- Mindre end 10% af kontroldyrerne døde under testen
- Koncentrationen af opløst ilt var ved testens afslutning større end 2 mg/l
- Referencestoffets toksicitet ligger inden for det angivne interval på 0,6-2,1 mg/l

6.4.4 Akut toksicitetstest med zebrafisk (*Danio rerio*)

Primærdata fra testene fremgår af GLP testrapporterne /23-26/.

Ingen af de tre enzymer medførte akutte, letale effekter overfor zebrafisk i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer), hvorfor EC værdier ikke kunne beregnes. De estimerede NOEC værdier for de nominelle og målte koncentrationer af enzymerne fremgår af tabel 6.5. De målte koncentrationer blev beregnet på baggrund af NVOC analyser.

Tabel 6.5
Resultater af akutttest zebrafisk (*Danio rerio*), baseret på nominelle og aktuelle, estimerede testkoncentrationer.

	NOEC, nominal konc., mg/l	NOEC, målt konc*., mg/l
AMG 300 L	≥100	≥85
Alcalase 2,5 L, Type DX	≥100	≥100
Pulpzyme® HC	≥100	≥100
Blanding	≥100	≥93

* Beregnet på baggrund af den gennemsnitlige NVOC værdi i intervallet 0-24 timer idet testopløsningerne blev fornyet hver 24. time.

Undersøgelserne opfylder de i metoderne specificerede validitetskriterier: /6,7/:

- Mindre end 10% af kontroldyrerne døde under testen
- Iltmætningen var ≥ 60% igennem hele testperioden
- Den gennemsnitlige koncentration af de testede stoffer var >80% af de nominelle koncentrationer i hele testperioden

7 Konklusion

Resultaterne af undersøgelsen af bionedbrydning i havvand samt akutte effekter af enzymerne AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC kan summeres som følger:

- AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC nedbrydes hurtigt og fuldstændigt i havvand. Kriteriet for bionedbrydelighed i havvand (60% af ThOD) blev for alle tre enzymer opnået i løbet af 3 dage mens fuldstændig nedbrydning af enzymerne (100% af ThOD) blev opnået inden for 12 dage.
- Alcalase 2,5 L, Type DX medførte en hæmmende effekt på vækstraten af *Skeletonema costatum* med en EC50 værdi på 17 mg/l og en NOEC på 5 mg/l (nominelle koncentrationer)
- Blandingen af de tre enzymer [AMG 300 L + Alcalase 2,5 L, Type DX + Pulpzyme® HC] medførte en hæmmende effekt på vækstraten af *Skeletonema costatum* med en EC50 værdi på 45 mg/l og en NOEC på 10 mg/l (nominelle koncentrationer)
- Alcalase 2,5 L, Type DX samt blandingen af de tre enzymer medførte ingen akutte effekter på *Daphnia magna* og *Danio rerio* i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer)
- AMG 300 L og Pulpzyme® HC medførte ingen akutte effekter på *Skeletonema costatum*, *Daphnia magna* og *Danio rerio* i de testede koncentrationer fra 1-100 mg/l (nominelle koncentrationer)

På baggrund af de opnåede resultater vil AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC ikke skulle klassificeres som miljøfarlige i henhold til Kommissionens Direktiv 67/548/EEC om klassificering af farlige stoffer /27/.

8 Anvendte malingsystemer

I de her foretagne undersøgelser er der anvendt en række forsøgsprodukter og i det omfang det er relevant et referenceprodukt. Forsøgsprodukterne er fremstillet med forskellige bindersystemer. For overskuelighedens skyld er der lavet en oversigt, hvor koder og bindersystemer for forsøgsprodukterne er angivet, se tabel 9.1.

Kode	Opl.middel	Bindersystem	Pigment	Tørstof %	PVK %	Enzym
F5 2001	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	69	53	P+A
F5.2 H10 A8	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	69	54	P+A+X
F5.3 H14 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	46	36	P+A+M
F5.4 H5 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	71	51	P+A+M
F5.5 H6 A12	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	71	51	P+A+X
F5.6 H4,5 A13,5	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	71	51	P+A
F5.7 H17	Aromat	Harpiks	TiO ₂	71	51	P+A
F5.8 H14 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	62	39	P+A
F5.9 H14 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂	72	53	P+A
F5.10 H14 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂ , ZnS	74	52	P+A
F5.11 H14 A4	Aromat	Harpiks / akryl	TiO ₂ , ZnS	56	43	P+A
118 H1,5 A14	Vand	Harpiks / akryl	TiO ₂	64	57	P+A+X
119 A15,5	Vand	Akryl	TiO ₂	68	56	P+A+X
120 H4 A11,5	Vand	Harpiks / akryl	TiO ₂	65	54	P+A+X
121 H3,3 V11,8	Vand	Harpiks / PVA	TiO ₂	65	54	P+A+X
204 U30	Vand	Polyurethan	TiO ₂	47	18	P+A+X
205 H9,8 V20	Vand	Harpiks / PVA	TiO ₂	47	18	P+A+X
207 V9,8 U20	Vand	PVA / polyurethan	TiO ₂	47	18	P+A+X
Reference	Ukendt	Ukendt	Ukendt	Ukendt	Ukendt	Intet

Følgende forkortelser anvendes i ovenstående tabel:

A = Amylase

M = Multicomplex

P = Protease

X = Xylanase

TiO₂ = Titandioxyd

ZnS = Zinksulfid

PVA = Polyvinylacetat

For hver serie F5, 100 og 200 er der efter første del af koden angivet yderligere en kode for bindertype(r) og bindertørstof. Generelt har serie F5 og serie 100 et relativt højt tørstof, typisk 60-75 vægt-%. Serie 200 har et noget lavere tørstofindhold, det ligger mellem 40-50 vægt-%. Enzymindholdet er typisk 5 vægt-% i alt, hvor en blanding af protease, glucoamylase, amylase multikompleks og xylanase er anvendt.

F5.8 har en pigmentvolumen-koncentration (PVK) på 44%. F5.9 svarer til den oprindeligt brugte F5 med en PVK på 53%. F5.10 indeholder zinksulfid og har en PVK på 52 %. F5.11 indeholder ligeledes zinksulfid og har en PVK på 43%. Til disse er der tilsat 5 vægt-% enzymopløsning, hvor kun protease (3%) og glucoamylase (2%) er anvendt.

9 Enzymers indvirkning på malingens konsistens

En maling skal have en konsistens (reologi), der bevirker, at den er nem at påføre. Samtidig må denne konsistens ikke ændres væsentlig med tiden. Det vil sige, produktet skal være lagerstabil. Tilsætning af enzymer til en maling kan bevirke ændringer i såvel konsistens som lagerstabilitet, hvorfor disse egenskaber er testet for et antal produkter med forskellige bindersystemer.

9.1 Måling af reologi

For at bestemme produkternes viskositet, påføringsegenskaber, udflydningsmekanismer såvel som tendens til bundfældning blev der målt forskellige reologiske egenskaber. Reologimålinger er foretaget med Bohlin Rheometer, VOR (Millennium software). Der er brugt standard geometrier til målingerne der er udført efter ISO 3219-93.

9.1.1 Viskositet

Viskositeten blev målt ved forskellige forskydningshastigheder, hvor prøvebægerets rotation bevirker, at strukturen i produktet nedbrydes. Målingen starter ved lav forskydningshastighed, der gradvis øges til høj forskydningshastighed, og straks derefter gradvis tilbage til lav forskydningshastighed igen.

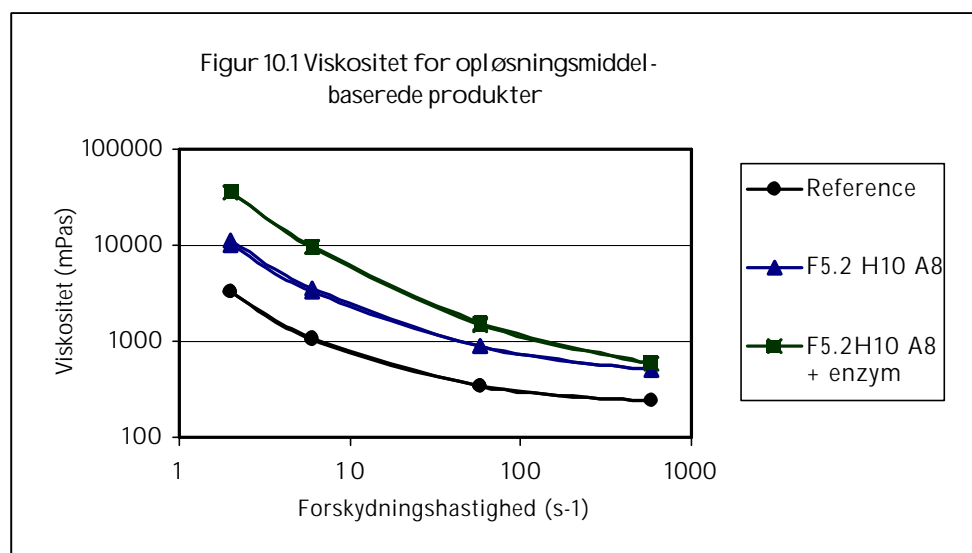
Målingerne viser om produkterne er Newtonske, forskydningsfortyndende eller tiksotrope. Newtonske produkter har altid samme viskositet uanset hvilken forskydningshastighed der måles ved. Forskydningsfortyndende produkter har en høj viskositet ved lave forskydningshastigheder hvor strukturen endnu ikke er nedbrudt, men i takt med at forskydningshastigheden øges nedbrydes strukturen, og viskositeten falder. Når der køres tilbage til lav forskydningshastighed stiger viskositeten igen til samme eller næsten samme niveau som ved "opkørslen", det betyder at de to kurver er næsten sammenfaldende, og er et tegn på at strukturen genopbygges hurtigt igen. Tiksotrope produkter viser samme udseende som forskydningsfortyndende, når der måles fra lav til høj forskydningshastighed, men når der måles fra høj mod lav forskydningshastighed sker genopbygningen af strukturen meget langsomt og kurven får et helt andet udseende, idet de to kurver ikke er sammenfaldende.

Alle produkter i denne måleserie er forskydningsfortyndende. Sammenstilling af resultater fra viskositetsmålingerne ses i tabel 10.1 .

Tabel 10.1 Viskositetsmåling på testprodukter med og uden enzym.

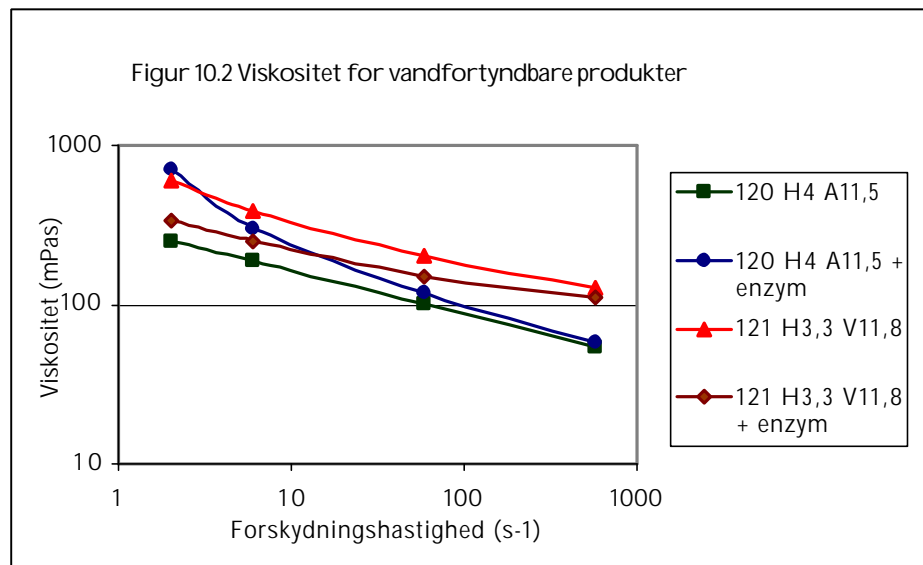
Prøve:	Reference	F5.2 H10 A8		119 A15,5		120 H4 A11,5		121 H3,3 V11,8	
Enzymindhold:		-	+	-	+	-	+	-	+
Forskydnings-hastighed (s-1)	Viskositet (mPas)	Viskositet (mPas)		Viskositet (mPas)		Viskositet (mPas)		Viskositet (mPas)	
2	3280	11300	36400	1140	632	252	710	604	338
6	1090	3600	9780	447	270	188	302	385	252
58	349	891	1560	162	105	101	118	202	152
581	242	506	589	69	58	55	58	128	111
58	340	880	1500	93	83	77	79	164	128
6	1050	3265	9490	170	155	127	153	302	201
2	3251	10100	36200	271	271	189	281	472	280

Et kommercielt opløsningsmiddelbaseret produkt er brugt som reference og målt til sammenligning. F5.2 H10 A8 der også er opløsningsmiddelbaseret viser at tilsætning af enzym giver en stigning i viskositet. I figur 10.1 er de opløsningsmiddelbaserede produkter sammenlignet.



De vandfortyndbare produkter ser ud til at have en større accept af enzym, det vil sige der sker ikke en så markant stigning i viskositeten. I figur 10.2 er to af de vandfortyndbare produkter med og uden enzym vist. Testprodukt 120 H4 A11,5 indeholder harpiks og akryl medens testprodukt 121 H3,3 V11,8 indeholder harpiks og polyvinylacetat. I det ene tilfælde stiger viskositeten ved tilsætning af enzym og i det andet tilfælde mindskes viskositeten. Endvidere er systemerne en lille smule tiksotrope.

For at kunne skelne prøverne grafisk er kun viskositet ved stigende forskydnings-hastighed vist i figur 10.2. Et produkt baseret på akryl alene (119 A15,5) giver faktisk en reduktion af viskositet ved tilsætning af enzym, hvorfor stigningen af viskositet for produkt 120 H4 A11,5 må skyldes kombinationen af de anvendte kvaliteter akryl og harpiks.



9.1.2 Oscillation

En anden reologisk målemetode er oscillation, hvor produktets struktur ikke nedbrydes, idet der i stedet for rotation påføres en sinusformet bevægelse (frekvens), derved får man et mål for viskositeten, når mikrostrukturen er intakt. Det kan relateres til viskositeten når produktet står på lager, hvorfor lav viskositet i stilstand kan medføre bundfældning af de tungere pigmentpartikler. Hvis et produkt bundfælder, kan det betyde, at kvaliteten af det påførte malinglag bliver uens hvis omrøringen ikke har været tilstrækkelig god. Produktets elasticitet, benævnt fasevinklen Delta, bestemmes også ved oscillationsmålingen. Værdierne for fasevinklen ligger mellem 0 og 90. Hvis fasevinklen er 0 betyder det, at produktet opfører sig som en elastik, det vil sige, når spændingen slippes går den umiddelbart tilbage til den oprindelige form. Hvis fasevinklen er 90 vil produktet opføre sig som et fast stof, det vil sige, at tiden inden produktet er tilbage i den oprindelige form bliver længere jo tættere man kommer 90. Resultaterne fra målingerne er gengivet i tabel 10.2 og 10.3.

Prøver:	Viskositet (mPas)								
	Reference	F5.2 H10 A8		119 A15,5		120 H4 A11,5		121 H3,3 V11,8	
Enzymindhold:		-	+	-	+	-	+	-	+
Frekvens									
2	1500	4360	8620	405	159	163	248	689	401
7	544	1150	2210	187	93	96	122	268	173
10	424	837	1690	155	77	81	102	210	142
7	472	1160	2090	181	88	92	113	260	163
2	958	4000	6440	350	138	149	205	601	343

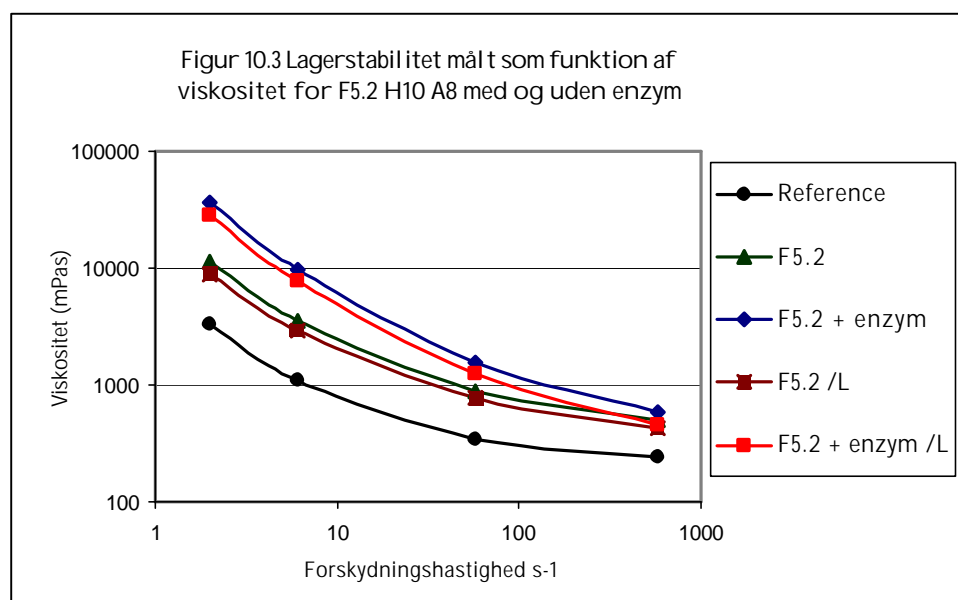
Tabel 10.2 viser tydeligt at enzymet har en stor indvirkning på det opløsningsmiddelbaserede systems viskositet. Endvidere giver enzymet også en større elasticitet (lavere fasevinkel), se Tabel 10.3. Referencen har en høj viskositet ved lav frekvens og er mere elastisk end ved højere frekvens. De vandfortyndbare systemer udviser generelt lavere viskositet og med de samme tendenser som ved almindelig rotationsviskosimetri. Hertil kommer at hvis viskositeten går ned ved tilsætning af enzym så går elasticiteten op og modsat.

Tabel 10.3 Måling af viskositet ved oscillation									
	Fasevinkel								
Prøver:	Reference	F5.2 H10 A8		119 A15,5		120 H4 A11,5		121 H3,3 V11,8	
Enzymindhold:		-	+	-	+	-	+	-	+
Frekvens									
2	53	61	48	62	75	76	59	57	60
7	63	65	54	61	69	69	62	54	58
10	64	65	56	60	63	64	59	53	57
7	64	65	54	62	67	69	62	55	59
2	58	62	46	64	75	78	65	59	63

9.2 Lagerstabilitet – accelereret metode

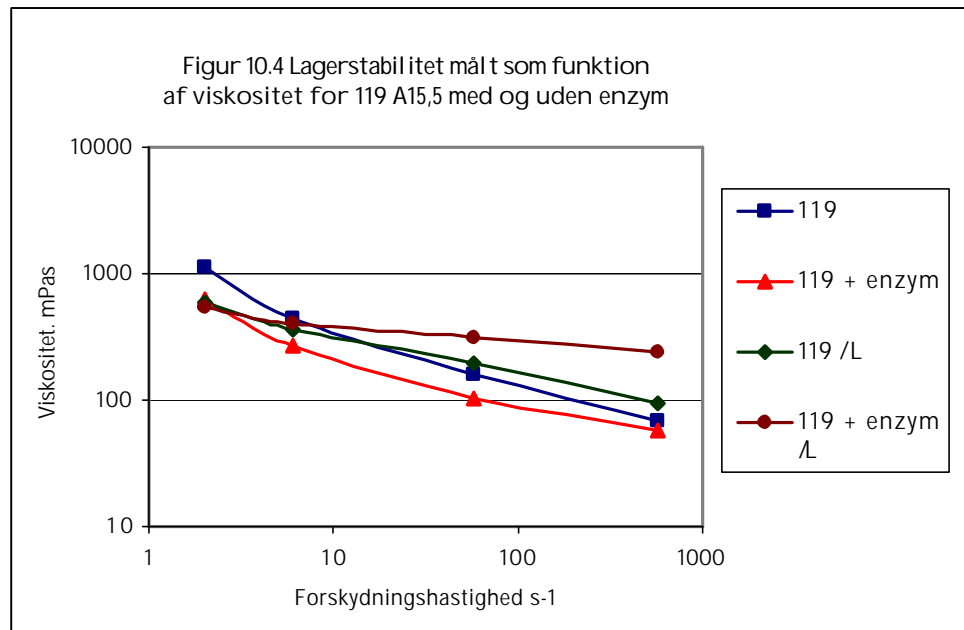
Formålet med at teste lagerstabiliteten er at undersøge enzymernes indvirkning på produktet ved henstand. En accelereret test er at anbringe produktet i en lukket beholder i varmeskab ved forhøjet temperatur i en kortere tid. Testen er i dette tilfælde udført ved 40°C i to uger af hensyn til enzymet. Erfaringsmæssigt svarer det til 3-4 måneders lagertid. Reologiske målinger er anvendt som evalueringsparameter for lagerstabilitet. Det vil sige, at reologien er bestemt inden start af lagertest og igen efter afslutning af forsøget. Sammenstilling af resultaterne fra før og efter lagerstabilitetsforsøget ses i figur 10.3-10.5, hvor /L betyder efter lagring.

Det opløsningsmiddelbaserede produkt falder lidt i viskositet ved lagring uanset om det indeholder enzym eller ej. Det betyder at enzymet ikke påvirker lagerstabiliteten i dette tilfælde (figur 10.3).

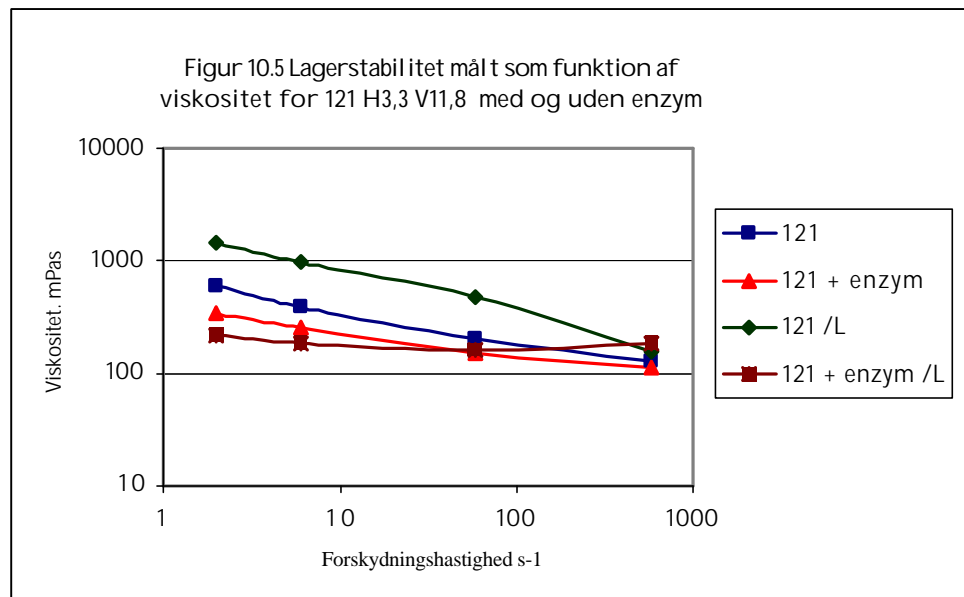


De vandfortyndbare testprodukter giver lidt forskellige resultater. Testprodukt 119 A15,5 udviser en svag stigning i viskositet ved de lave forskydningshastigheder. Enzymet forstærker denne tendens, se figur 10.4. Det betyder at produktet bliver mindre forskydningsfortyndende.

Test produkt 120 H4 A11,5 bliver til en gel efter der er tilsat enzym og lagerstabilitetstest er udført. Derfor er produktet ikke repræsenteret i figurene.



Endelig giver testprodukt 121 H3,3 V11,8 en generel stigning i viskositet under lagerstabilitetstest uden enzym. Ved tilsætning af enzym bliver produktet tyndere og efter lagertest næsten Newtonsk, hvilket betyder at den er meget lidt afhængig af forskydningshastigheden (se figur 10.5).



9.3 Konklusion

De undersøgelser der er udført viser, at enzymer påvirker malingens konsistens og holdbarhed. Det opløsningsmiddel baserede produkt udviser en stigning i viskositet ved tilsætning af enzym, men påvirkes til gengæld ikke

med hensyn til lagerstabilitet. De vandfortyndbare produkter påvirkes ikke nær så meget hvad angår konsistens, men til gengæld kan det konkluderes at selve bindersystemet er afgørende for om produktet er lagerstabilt eller ej.

10 Vandoptag og Enzymanalyse

Enzymaktivitet kan kun opnås, hvis der er vand til stede. Det forventes endvidere, at enzymer bliver udvasket fra malingsystemet, og at jo mere vand malingsystemet optager, desto hurtigere bliver udvaskningen. Det antages at der findes en optimal vandoptagelse i malingsystemet, hvor enzymet er aktivt, men ikke bliver udvasket alt for hurtigt.

Bestemmelse af vandoptagelse i malingsfilmen er derfor gennemført for et antal malingsystemer med forskellige bindersystemer. Disse målinger er blandt andet anvendt til at udvælge malinger til videre undersøgelse.

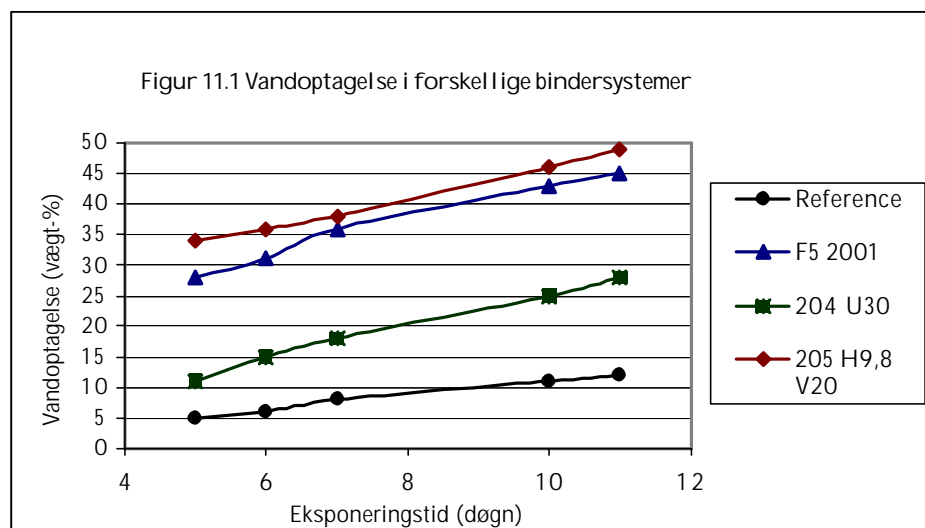
Aktiviteten hos enzymet i den tørre malingsfilm ved kontakt med vand er af interesse, da aktiviteten er en forudsætning for, at enzymerne skal virke begroingshæmmende. Derfor er der indarbejdet en metode til bestemmelse af enzymaktivitet. Et enzym består hovedsageligt af protein. Som komplement til enzymaktivitetsmåling kan proteinmængden i en udvaskningsvæske derfor bestemmes. Begge metoder er spektrofotometriske, hvor man måler absorbans på en væskefase ved henholdsvis 425 nm og 595 nm bølglængde.

10.1 Vandoptagelse

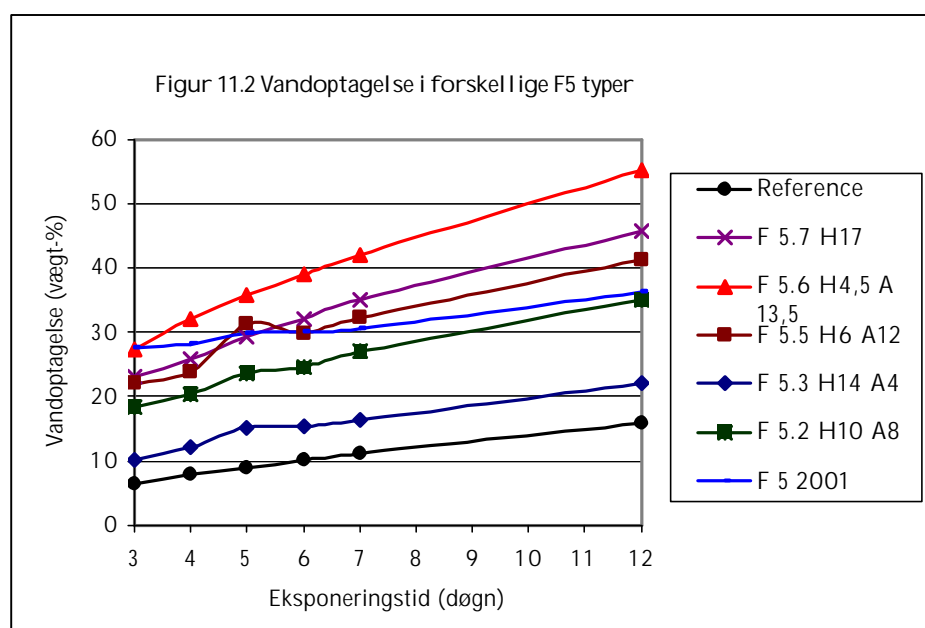
Malingsystemerne er påført glas- eller akrylplader med en lakpåfører med en spalteåbning på 240 μm . Malingens tørretid er ca. 1 døgn, dog op til en uge for nogle enkelte vandbaserede malingstyper. Pladerne vejes før og efter påføring for at kunne registrere mængden af maling (i gram) der er påført en given plade. Bagefter placeres de malede plader i en marin saltopløsning eller i almindeligt vand, og vandoptagelsen registreres hvert døgn til indtil ligevægt eller at en klar tendens kan ses. Saltopløsningen er kunstigt fremstillet havvand, med en saltprocent der efterligner naturligt havvand. Saliniteten ligger i intervallet 31-35 ppt, og pH i intervallet 7,8-8,2. De registrerede resultater visualiseres i form af diagrammer, hvor x - akse er eksponeringstid i døgn, og y - akse er vandoptagelse i % malingsvægt.

Der er udført en screening med forskellige bindersystemer. Det kan ses i figur 11.1, at der er store forskelle mellem de forskellige testprodukter, samt at referencen har et lavt vandoptag på 10-12 vægt-%. Undersøgelserne er udført uden tilsætning af enzym.

De bindersystemer, der optager de største vandmængder må formodes at give en forholdsvis større udvaskning af enzym fra malingsystemet. Det bør også bemærkes at hvis vandoptagelsen på et tidspunkt når et plateau, hvor der er ligevægt vil malingen indeholde en konstant mængde vand.



Med denne baggrund er der udført yderligere en test, hvor det opløsningsmiddelbaserede produkt F5 er varieret med hensyn til forholdet mellem harpiks og akryl. Denne test viser, at kombinationen af bindemidler har stor indflydelse på vandoptagelsen, hvorfor der er behov for en optimering af bindersystemet. Se figur 11.2.



Det interessante ved denne undersøgelse er at F7 H17 med ren harpiks optager meget vand, men det gør F5.5 H6 A12 og F5.6 H4,5 A13,5 også, der indeholder en blanding af harpiks og akryl, hvor der er meget akryl tilstede. Det produkt der klarer sig bedst er faktisk F5.3 H14 A4 som indeholder mest harpiks og en lille mængde akryl. Dette viser at vandoptagelsen er afhængig af at forholdet mellem de to bindemidler. Hvilket indebærer at man faktisk for hver ny kombination burde kontrollere tendensen til optagelse af vand.

10.2 Principper for måling af enzymaktivitet

Enzymet Alcalase nedbryder casein under meget specifikke reaktionsforhold. (temperatur 50°C, pH 9, casein som substrat).

Enzymaktiviteten er målt efter reduktionen i casein koncentration som skyldes enzymets nedbrydning af det samme.

Udover det optimale pH og den optimale temperatur bør substratkoncentrationen være meget højere end enzymkoncentrationen for at opnå en maksimal reaktionshastighed. Tilstedeværelse af en relativt høj mængde af casein gør at alle aktive steder på enzymet deltager i reaktionen, og enzymet bliver "mættet" af substratet. Reaktionshastigheden er nu kun en funktion af enzymkoncentrationen, og er uafhængig af substrat koncentrationen.

Ved udarbejdelse af en reference kurve arbejder man med koncentrationer, som giver en lineær, eller næsten lineær sammenhæng. For at kunne iagttage ændringer forårsaget af enzymaktivitet anvender man et gult farvestof, som giver en pink farve i kontakt med casein (pH 9), og som ændrer farve fra pink til gul i løbet af enzymreaktionen pga. caseinets hydrolyse (nedbrydning). Jo mørkere væsken er, desto mere enzym er der i opløsningen. Ved analyse af enzymaktivitet anvender man lys til at måle farveændringer som resultater af enzymaktivitet. For at måle enzymets aktivitet måles der ændringer i absorbansværdi (farveændring) med et spektrofotometer ved bølgelængde 425 nm over for en blank prøve uden enzym. En højere absorbansværdi er resultatet af en højere proteolytisk aktivitet.

Det er vigtigt at holde alle de operationelle parametre, som pH, identitet og molaritet af buffersystem, reaktions tid samt temperatur konstant under hvert forsøg. Koncentration af enzymet i anvendte enzymopløsninger, samt substrat mængde bør være nøjagtigt de samme hver gang. På denne måde standardiseres målingernes forhold, sådan at enzymet i samme mængde skal vise reproducerbare resultater fra et forsøg til et andet.

(P.R. Mathewson: Analysis of enzymes activity, I Enzymes, Eagan Press Handbook Series, USA, 1998)

10.3 Bestemmelse af reference kurve

Der fremstilles 5 standardenzymopløsninger ud fra en stamopløsning lavet af et bestemt enzym med kendt aktivitet. Koncentrationerne beregnes og registreres. Der udtages 1,0 ml af hver enzymopløsning til reagensglas, som hver indeholder 1,5 ml buffer, undtagen de blanke prøver, hvor der er 2,5 ml buffer (pH 9). Der laves dobbelt bestemmelse for hver enzymkoncentration, og 4 blanke prøver. Reagensglassene sættes i vandbad ved 50°C. Efter 2 minutter tilsættes der 1 ml casein til den første blanke prøve, der rystes, og tilsættes 250 µl gult farvestof, prøven rystes igen og sættes tilbage på plads i vandbadet. Proceduren gentages 2 minutter efter for den næste prøve, o.s.v. Efter 27 minutter ved 50°C afbrydes reaktionen i den første prøve med 2,5 ml isvand. Derefter afbrydes reaktionen i de øvrige prøver med 2 minutter mellemrum. På denne måde er reaktionstiden for hver prøve ens, og lig med 25 minutter. Farven i reagensglassene ændres i løbet af reaktionen fra pink til gul. Absorbansen skal måles indenfor 1 time efter reaktionens afbrydelse. Absorbansen i prøver med enzymopløsninger måles over for en blank prøve. To blanke prøver bør vise absorbansværdi 0 +/-0,001 over for hinanden.

10.4 Måling af enzymaktivitet

Malingen påføres en engangspipetter ved at dyppe den tykke ende af pipetten i malingen. Hver malingstype påføres på et antal pipetter for at undersøge reproducerbarheden. Malingen tørrer i ca. 1 døgn. Pipetterne vejes før og efter påføring, sådan at malingens vægt i gram er registreret, og enzyemmængden i mg kan beregnes ud fra det procentvis indhold af enzym (Alcalase) i malingen. De tørre pipetter bliver herefter dyppet i reagensglas, som indeholder en given mængde (4 ml) buffer med pH 9. Efter 3 døgn udvaskning udtages der 2,5 ml "udvaskningsbuffer" fra hvert reagensglas og enzymaktiviteten måles spektrofotometrisk.

Absorbansen registreres og omregnes til absorbans per mg enzym for hver prøve for at kunne sammenligne resultaterne.

I tabel 11.1 er resultatet for fire malingsprøver vist. Det kan ses, at det påførte malingslag varierer i vægt. Forskellen i vægt mellem de forskellige prøver skyldes formentlig forskellig viskositet. Endvidere giver manuel påføring altid en vis variation, der blandt andet skyldes at påføringshastigheden næppe er helt ens fra gang til gang. Det betyder, at mængden enzym i prøven varierer. Endvidere varierer antallet prøver mellem 4-6, hvilket skyldes, at nogle malingsprøver er bleven sorteret pipetter fra på grund af uensartet malingsfilm.

Absorbansen målt på udvaskningsbufferen er af samme størrelsesorden, men med varierende standardafvigelse. Til gengæld er variationen ved beregning af absorbans per mg enzym i alle tilfælde acceptabel, da standard afvigelsen varierer fra 0,1-0,4. Det kan også ses i tabel 11.1 at de forskellige forsøgsprodukter giver en indikation på at bindervalget har betydning for udvaskningen og at det opløsningsmiddelbaserede produkt relativt set afgiver mindst enzym.

Prøve	Antal prøver	Maling (g)		Enzym (mg)		Absorbans ved 425 nm		Absorbans/mg enzym	
		Gennemsnit	Std.afv.	Gennemsnit	Std.afv.	Gennemsnit	Std.afv.	Gennemsnit	Std.afv.
118 H1,5 A14	6	0,265	0,009	5,296	0,178	1,376	0,084	0,260	0,014
119 A15,5	5	0,228	0,031	4,562	0,620	1,292	0,076	0,287	0,039
120 H4 A11,5	6	0,253	0,019	5,060	0,385	1,328	0,038	0,264	0,021
F5.2 H10 A8	4	0,367	0,030	7,337	0,608	1,281	0,015	0,175	0,015

10.5 Bestemmelse af enzym ved måling af protein

Måling af enzymaktivitet er en metode, der registrerer tilstedeværelsen af Alcalase. Metoden tager derfor ikke hensyn til alle de enzymer, der er tilsat malingssystemet. Derfor blev det besluttet, at proteinmængden skal måles som et komplement til enzymaktivitet i forbindelse med udvaskningsforsøg. Metoden er kort beskrevet i de næste afsnit.

10.6 Bestemmelse af protein - Reference kurve

Der fremstilles 3-5 opløsninger med forskellige koncentrationer af et kendt standardprotein (gammaglobulin). Et blåt opløseligt farvestof anvendes som reagens. Der tilsættes 2,5 ml af en farveopløsning til hver proteinprøve. Prøvernes indhold rystes, og inkuberes ved stuetemperatur i mindst 5 minutter. Proteinmålingerne udføres spektrofotometrisk hvor absorbansen måles ved 595 nm indenfor 1 time fra fremstilling af prøven. Blanke prøver (0-prøver) der måles som referencer indeholder ikke protein, kun buffer.

10.7 Måling af protein

Fremgangsmåden ved proteinmåling i ukendte prøver er den samme som for referenceopløsninger. Der anvendes 500 μ bufferudvask fra alle prøver med ukendt proteinindhold til forsøg.

Proteinkoncentrationens ændring er relateret til absorbans ændringen, som måles ved 595 nm bølgelængde. Protein giver en mere eller mindre intensiv blå farve. Jo mere protein, desto mere intensiv farve, og jo højere absorbansværdi. De ukendte proteinkoncentrationer findes/aflæses ud fra en reference kurve, som er opbygget på baggrund af de kendte proteinkoncentrationer og tilsvarende absorbansværdier.

10.8 Konklusion

Generelt kan det konstateres, at vandoptagelsen kan styres, blandt andet, ved at optimere bindemiddelsystemet. Samtidig kan det konstateres at en opløsningsmiddelbaseret maling normalt vil være tættere end en vandfortyndbar maling alene på grund af måden den danner malingsfilm på. Der er selvfølgelig også en række andre parametre der har indflydelse på vandoptagelsen, for eksempel valg af pigment og fyldstof, pigmentvolumenkonzentration og samlet tørstof.

Det kan også konstateres at det er muligt at bestemme enzymaktivitet som funktion af absorbans ved 425 nm med en rimelig nøjagtighed. Det er dog vanskelig udfra dette begrænsede antal forsøgt at konkludere hvordan forskellige prøvningsparametre har indflydelse på resultatet, men det må konstateres, at prøvningen bør laves minimum som trippel bestemmelse med så ensartede prøvebetingelser som muligt.

Som alternativ til bestemmelse af enzymaktivitet (her Alcalase) kan protein bestemmes som funktion af absorbans ved 595 nm. Denne måling vil være et udtryk for den samlede mængde enzym/protein der bliver udvasket fra malingen.

11 Udvaskning af enzym

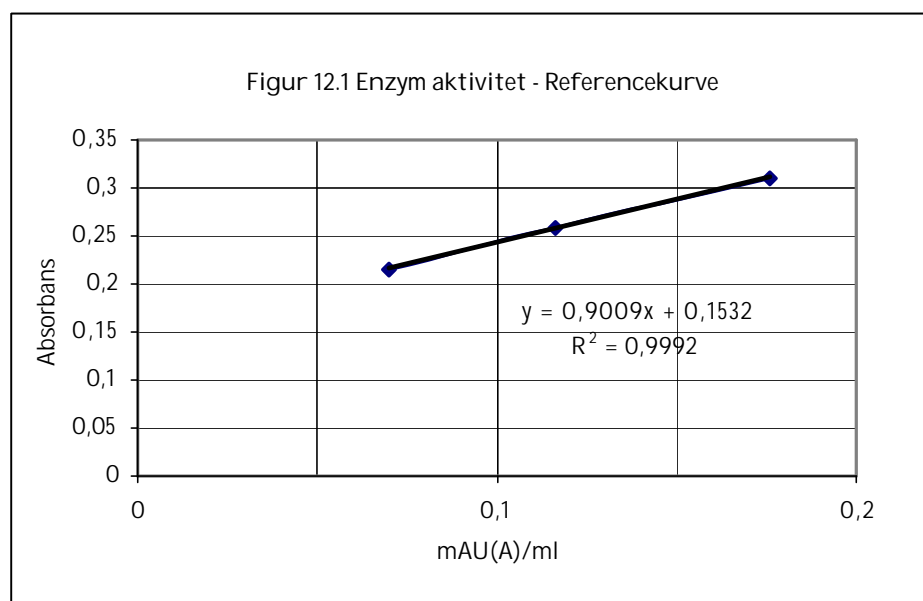
For at bestemme enzymets udvaskningshastighed fra en malingfilm er der udført målinger af enzymaktivitet i udvaskningsvæske fra nogle neddypningsforsøg med 4 forskellige malingsystemer. Et antal pipetter blev påført maling ved at dykke pipetten i maling. Efter 1 døgns tørring er de enkelte pipetter neddyppet i buffer.

Enzymaktiviteten i udvaskningsbufferen blev herefter målt for at undersøge, hvor meget af det aktive enzym der er udvasket. Efter et døgns udvaskning udtages der 2,5 ml "udvaskningsbuffer" fra hvert reagensglas og enzymaktiviteten måles spektrofotometrisk. Samtidig bliver pipetterne dyppet i 4 ml "ren" ny buffer. Man skifter bufferen med intervaller fra 1 dag til 1 uge for at have mulighed for at måle den enzymmængde, som bliver udvasket. I starten skiftes der buffer daglig, fordi udvaskningen er størst i begyndelsen. De spektrofotometriske målinger fortsættes indtil der ikke længere kan måles enzymaktivitet i udvaskningsbufferen.

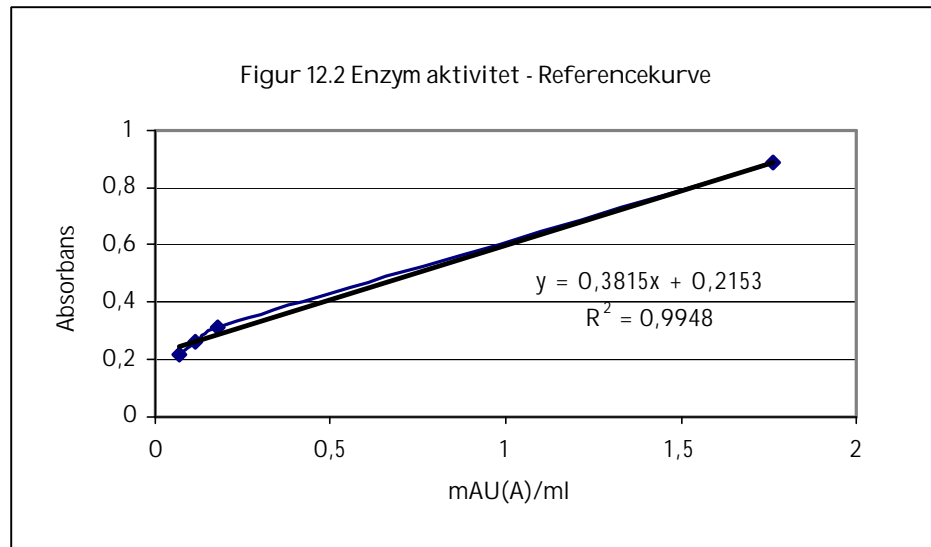
Parallelt er også målt proteinkoncentration i udvaskningsbufferen. Proteinmålingen udføres på 500 µl af den samme udvaskningsvæske, som der bruges til enzymaktivitetsmålingen, med den forskel at der måles proteinindhold i stedet for enzymaktivitet.

11.1 Enzymaktivitet ved udvaskning – referencekurve

Der er udført måling af enzymaktivitet ved kendte enzymkoncentrationer for at kunne lave en referencekurve indenfor det ifølge analysemetodens optimale måleområde. I figur 12.1 er enzymaktiviteten afsat som funktion af absorbans. Der er udført en lineær regression indenfor måleområdet og en beregning af tilpasning. Denne referencekurve blev anvendt til den første serie udvaskningsforsøg.

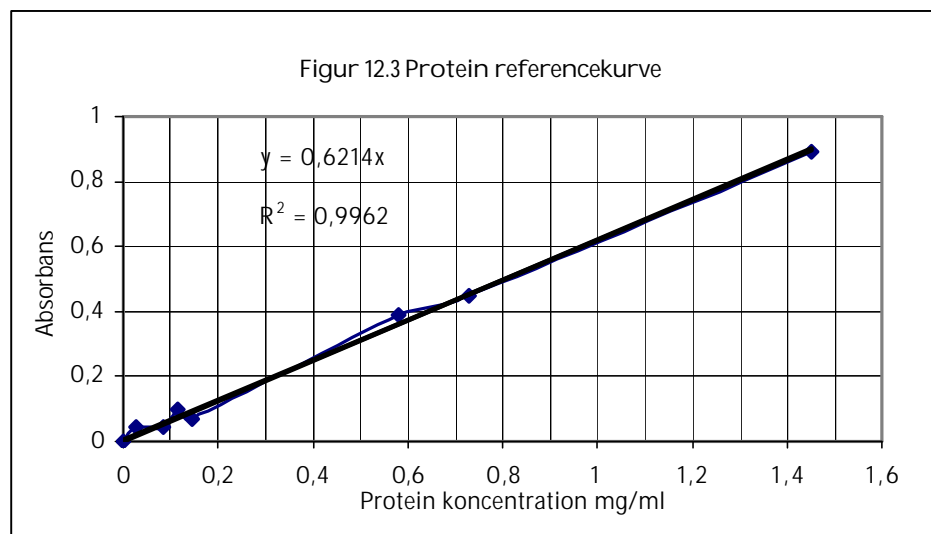


Da referencekurven dækkede et relativt lille måleområde for absorbans, blev referencemålingerne udvidet med en måling med høj enzymkoncentration. Desværre er referencekurven ikke lineær i hele området, hvilket betyder at måleresultaterne teoretisk set svarer til et polynom. Forenklet set kan man også betragte referencekurven som en lineær regression over hele område. Dette valg giver en lidt større usikkerhed. Dog kan det konstateres at tilpasningen for regressionen stadig er god, hvilket må betyde at den beregnede enzymaktivitet giver et rimeligt skøn af udludningens størrelsesorden. I figur 12.2 kan referencekurven ses. Denne referencekurve er anvendt til den anden serie forsøg.



11.2 Proteinindhold ved udvaskning – referencekurve

Der er udført måling af proteinindhold på kendte proteinkoncentrationer for at kunne lave en referencekurve. I figur 12.3 er koncentrationen af protein afsat som funktion af absorbans. Der er lavet en lineær regression indenfor måleområdet og en beregning af tilpasning.



11.3 Indledende måling af enzymaktivitet og protein i udvaskningsbuffer

Der er udført målinger på udvasket enzym i udvaskningsbuffer for fire malingsystemer ved hjælp af enzymaktivitet og protein målinger. Malingerne er tilsat 5 % enzymopløsning (protease, glucoamylase og xylanase). Ved udførelse af analysen var der nogen variation mellem den mængde maling der påføres den enkelte pipette. Udvasningsbufferen er skiftet med passende mellemrum og der er målt enzymaktivitet og proteinindhold på bufferprøverne. Malingsfilmene har henstået 11 dage hvorefter udvaskningen i buffer er påbegyndt. Forsøget blev stoppet efter 3 døgn, da de målte absorbanser (E) på dette tidspunkt var meget små. Ved hjælp af referencekurverne kan enzymaktivitet respektive proteinindhold i udvaskningsbufferen beregnes på baggrund af absorbansen. Når absorbansen bliver for lav kan enzymaktiviteten ikke beregnes, da resultatet ligger udenfor referencekurven. Proteinindholdet kan beregnes selvom absorbansen er lav da referencekurven går igennem 0.

Resultatet viser at den opløsningsmiddelbaserede maling afgiver væsentlig mindre mængde enzym/protein end de vandfortyndbare produkter. Endvidere kan det konkluderes at udludningen af enzym ser ud til at stagnere på en lav afgivelse efter de første par døgn. De indledende forsøg er beskrevet i bilag C.

For at sikre resultaternes validitet er der udført yderligere kontrolmåling på den opløsningsmiddelbaserede maling, men i fire forskellige formuleringer. Endvidere var der behov for at måle udludning over et længere tidsrum for at se om udludningshastigheden bliver konstant og for at undgå for lav absorbans. Dette betyder at eksponeringstiden i buffer må ændres efterhånden som udludningshastigheden bliver lavere.

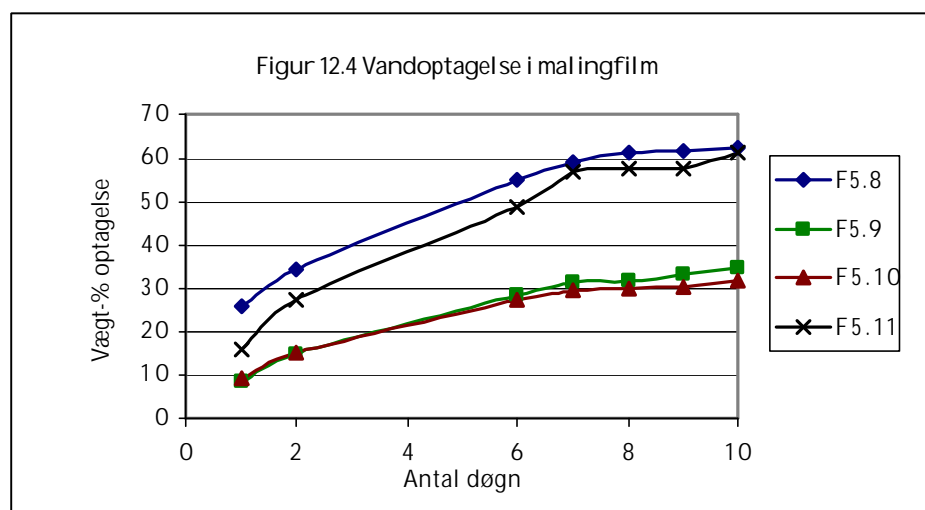
11.4 Måling af vandoptagelse

Der er på baggrund af de indledende analyser udvalgt ét malingsystem til de videre undersøgelser. Malingsystemet er det opløsningsmiddelbaserede F5, hvor vandoptagelsen er minimeret. Hertil kommer at det samlede tørstofindhold er varieret.

Endvidere er en del af titandioxyden skiftet ud med zinksulfid der formodes at have en algicid virkning. Dette pigment har været anvendt i mange år i forskellige sammenhænge blandt andet også i forbindelse med fødevareremballage (FDA godkendt).

F5.8 har en pigmentvolumen-koncentration (PVK) på 44%. F5.9 svarer til den tidligere brugte F5 med en PVK på 53%. F5.10 indeholder zinksulfid og har en PVK på 52 %. F5.11 indeholder ligeledes zinksulfid og har en PVK på 43%. De fire malinger F5.8-F5.11 er formuleret ud fra en betragtning om at opnå forskellig vandoptagelse. Der er tilsat enzym i produkterne inden påføring og test af vandoptag.

De fire malinger har forskellig vandoptagelse i marint saltvand, hvor PVK ser ud til at bestemme vandoptaget. Se figur 12.4. Faktisk giver den høje PVK et lavere vandoptag. Dette må betyde at når binderandelen bliver større kan malingsfilmen optage mere vand.



11.5 Måling af enzymaktivitet i udvaskningsbuffer

Der er tilsat 5 % enzymopløsning, hvor kun protease (3%) og glucoamylase (2%) er anvendt.

I tabel 12.1 kan de på pipetterne påførte mængder maling og de målte absorbanser (E) ses. Absorbansen er målt efter forskellige udludningstider, hvilket også ses i tabel 12.1, hvor absorbansen (E) angives med det antal døgn som eksponeringen er udført i. For at få den samlede eksponeringstid skal antallet af døgn lægges sammen. Målingerne er stoppet efter en samlet eksponeringstid på 59 døgn, da der begyndte at optræde blærer i malingsfilmen. Dette skyldes formentlig bufferens pH.

En reduceret PVK kan direkte ses som en reduceret absorbans. Med andre ord en mindre udvaskning af enzym (Alcalase). Samtidig bør det bemærkes at reduceret PVK betyder lavere viskositet (et tyndere produkt) og en mindre lagtykkelse, hvilket betyder lavere enzymmængde. Faktisk er der også forskel på om malingen indeholder zinksulfid eller ej. Dog er forskellen ikke ret stor når PVK er på det høje niveau.

Tabel 12.1 Påførte mængder maling på pipetter og målt absorbans (enzymaktivitet).

Maling	Mængde maling (g)	Alcalase-opløsning (mg)	mAU tilsat maling-filmen	E 1. døgn	E 2. døgn	E 4. døgn	E 8. Døgn	E.16 døgn	E. 28 døgn
F5.8	0,606	32,76	81,89	0,02	0,07	0,06	0,23	0,05	0,05
F5.8	0,627	33,89	84,73	0,02	0,02	0,04	0,17	0,01	0,09
F5.9	1,183	49,64	124,09	0,73	0,84	1,04	0,86	1,33	1,38
F5.9	1,096	45,99	114,97	0,73	0,89	1,04	0,86	1,32	1,34
F5.10	1,561	63,71	159,29	0,71	0,87	1,06	0,89	1,36	1,32
F5.10	1,362	55,59	138,98	0,75	0,92	1,10	0,88	1,27	
F5.11	0,390	20,89	52,23	0,22	0,34	0,21	0,94	0,41	0,02
F5.11	0,314	16,82	42,05	0,10	0,24	0,11	0,44	0,16	0,24

Det skal bemærkes at den nye referencekurve kun er brugt til prøve F5.9 og F5.10, da de målte absorbanser her er høje. Til de to andre prøver er en lineær regression nede i det lave lineære område anvendt.

På grund af den store datamængde er de beregnede resultater vist i to tabeller, hvor tabel 12.2 indeholder den beregnede enzymaktivitet og den udvaskede

mængde ”enzymopløsning” i mg og tabel 12.3 viser mængden Alcalase i malingsfilmen.

I tabel 12.2 kan det ses at absorbanterne for to af malingsfilmene er meget små. Når måleresultatet er udenfor referenceområdet kan den beregnede enzymaktivitet blive negativ. Dette kan betragtes som at udludningen er så lav at måleresultatet er et udtryk for metodens usikkerhed.

Tabel 12.2 Beregnede resultater for enzymaktivitet og udvasket mængde enzym.

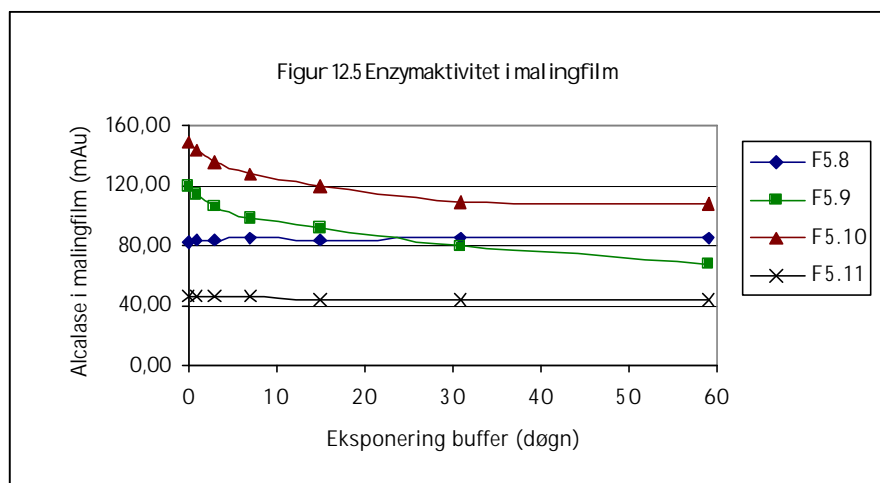
Prøver	Enzymaktivitet (mAU/ml) Efter eksponeringstid i døgn						Udvasket mængde ”Alcalase-opløsning” (mg) efter eksponeringstid i døgn					
	E1	E2	E4	E8	E16	E28	E1	E2	E4	E8	E16	E28
Maling												
F5.8	-0,15	-0,10	-0,10	0,09	-0,12	-0,11	-0,24	-0,15	-0,16	0,14	-0,19	-0,18
F5.8	-0,15	-0,15	-0,13	0,02	-0,15	-0,07	-0,24	-0,24	-0,20	0,04	-0,25	-0,12
Gns	-0,15	-0,12	-0,11	0,06	-0,14	-0,09	-0,24	-0,19	-0,18	0,09	-0,22	-0,15
F5.9	1,36	1,63	2,16	1,68	2,93	3,06	2,17	2,61	3,46	2,69	4,68	4,90
F5.9	1,34	1,77	2,17	1,69	2,90	2,94	2,15	2,84	3,47	2,71	4,65	4,71
Gns	1,35	1,70	2,17	1,69	2,92	3,00	2,16	2,72	3,47	2,70	4,66	4,80
F5.10	1,31	1,72	2,22	1,77	2,99	2,89	2,10	2,74	3,55	2,84	4,78	4,63
F5.10	1,41	1,84	2,31	1,75	2,75		2,25	2,94	3,69	2,81	4,41	
Gns	1,36	1,78	2,26	1,76	2,87	2,89	2,17	2,84	3,62	2,82	4,59	2,32
F5.11	0,08	0,21	0,06	0,88	0,28	-0,15	0,12	0,33	0,10	1,40	0,45	-0,24
F5.11	-0,05	0,10	-0,05	0,32	0,01	0,10	-0,09	0,16	-0,08	0,51	0,02	0,16
Gns	0,01	0,15	0,01	0,60	0,15	-0,03	0,02	0,25	0,01	0,95	0,23	-0,04

I tabel 12.2-12.3 kan det ses at udvaskningen er under usikkerheden for målingerne for en af prøverne. Der er en prøve der giver en meget lav udvaskning og to prøver der udviser en tydelig udvaskning af Alcalase.

Tabel 12.3 Beregnede resultater for reduktion i enzymaktivitet tilsat malingsfilmen.

Prøver	Enzymaktivitet i malingsfilm (mAU) efter eksponeringstid i døgn						
	0	1	3	7	15	31	59
Maling							
F5.8	81,89	82,49	82,87	83,27	82,92	83,39	83,84
F5.8	84,73	85,34	85,93	86,43	86,34	86,95	87,24
Gns	83,31	83,91	84,40	84,85	84,63	85,17	85,54
F5.9	124,09	118,66	112,14	103,49	96,77	85,06	72,82
F5.9	114,97	109,59	102,49	93,81	87,04	75,42	63,66
Gns	119,53	114,13	107,31	98,65	91,90	80,24	68,24
F5.10	159,29	154,05	147,19	138,32	131,22	119,27	107,69
F5.10	138,98	133,36	126,00	116,78	109,76	98,74	
Gns	149,13	143,70	136,59	127,55	120,49	109,01	107,69
F5.11	52,23	51,93	51,10	50,86	47,36	46,23	46,84
F5.11	42,05	42,27	41,86	42,06	40,79	40,74	40,35
Gns	47,14	47,10	46,48	46,46	44,07	43,49	43,59

Resultaterne fra tabel 12.3 kan ses i figur 12.5, hvor forskellen mellem de fire malinger er vist. Prøve F5.8 og F5.11 har begge lav PVK, hvilket ser ud til at begrænse udvaskningen af enzym hvor F5.9 og F5.10 med den høje PVK giver en væsentligt større udvaskning specielt de første døgn. Ved sammenligning af F5.9 efter 3 døgn eksponering med målingen af enzymaktivitet for F5 i den første serie målinger kan de konstateres at være af den samme størrelsesorden.

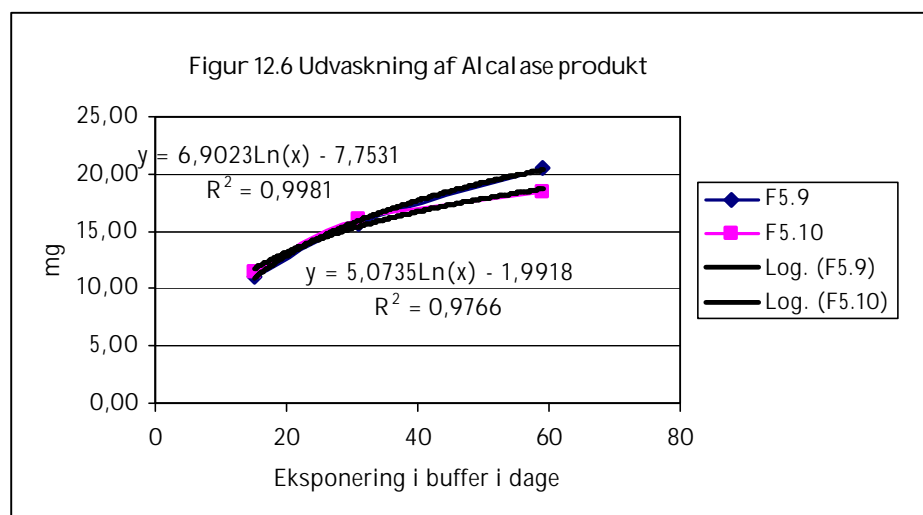


I de videre beregninger er F5.8 og F5.11 udelukket da usikkerheden er for stor. Tabel 12.4 viser ændringen i mængde enzym produkt i malingsfilmen.

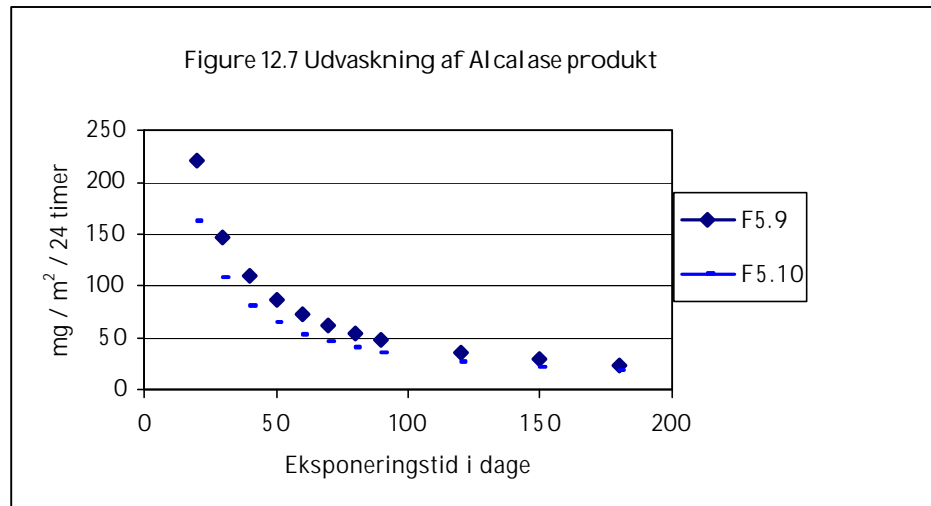
Tabel 12.4 Beregnede resultater for restmængde Alkalase i malingsfilmen.

Prøver	Mængde "Alkalase-opløsning" i malingsfilmen (vægt %) efter eksponeringstid bufferen i døgn						
	0	1	3	7	15	31	59
F5.9	4,20	4,02	3,80	3,50	3,28	2,88	2,46
F5.9	4,20	4,00	3,74	3,43	3,18	2,76	2,33
Gns	4,20	4,01	3,77	3,46	3,23	2,82	2,40
F5.10	4,08	3,95	3,77	3,54	3,36	3,05	2,76
F5.10	4,08	3,91	3,70	3,43	3,22	2,90	2,76
Gns	4,08	3,93	3,73	3,49	3,29	2,98	2,76

For at kunne ekstrapolere udvaskningen af Alkalase produkt over længere tid er der lavet en regression. Figur 12.6 viser hvordan Alkalase produktet udvaskes med tiden, hvor en logaritmisk regression giver en god tilpasning.



Ved at anvende regressionerne kan mængden Alkalase produkt der udvaskes beregnes i $\text{mg}/\text{m}^2/24$ timer. Resultatet kan ses i figur 12.7, hvor de ekstrapolerede værdier viser at udvaskningen langsomt reduceres med tiden. Efter 3 måneder er den af størrelsesorden $50 \text{ mg}/\text{m}^2/24$ timer, og reduceres stadig.



11.6 Måling af protein i udvaskningsbuffer

Da enzymaktivitetsmålingen alene er udtryk for udvaskningen af Alcalase er der også her målt udvaskning af protein, der er et udtryk for den samlede enzymudvaskning. I tabel 12.5 er den påførte mængde på pipetterne, den samlede mængde enzymopløsning og den målte absorptions (E) angivet.

Tabel 12.5. Påførte mængder maling på pipetter og målt absorptions (protein).

Maling	g maling	Enzym/proteinopløsning (mg)	Protein (mg)	E1	E2	E4	E8
F5.8	0,606	54,54	4,77	0,80	0,95	0,55	0,56
F5.8	0,627	56,43	4,93	1,00	0,86	0,61	0,68
F5.9	1,183	82,69	7,23	0,39	0,35	0,62	0,63
F5.9	1,096	76,61	6,70	0,37	0,39	0,68	0,60
F5.10	1,561	106,15	9,28	0,40	0,41	0,63	0,80
F5.10	1,362	92,62	8,10	0,46	0,46	0,70	0,68
F5.11	0,390	34,71	9,28	0,47	0,42	0,52	0,41
F5.11	0,314	27,95	8,10	0,54	0,41	0,48	0,45

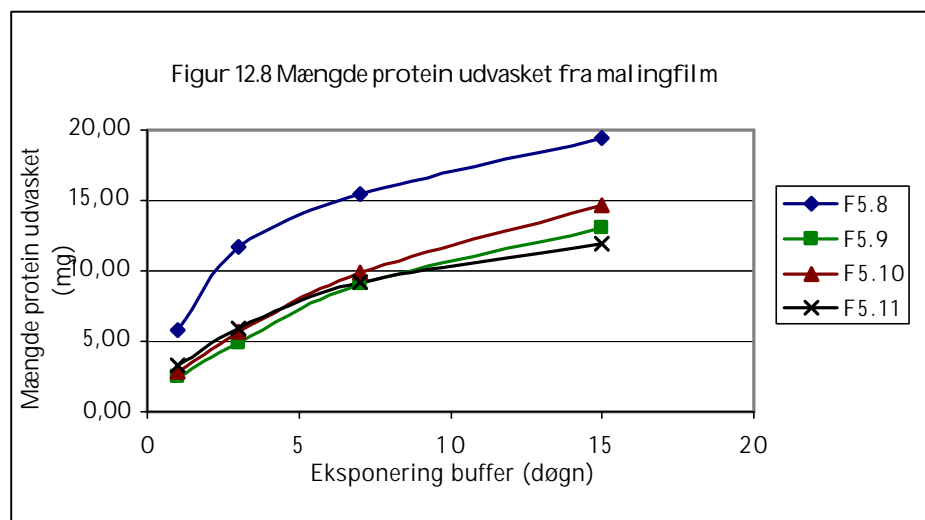
Ved hjælp af referencekurven beregnes proteinindholdet i udvaskningsbufferen på baggrund af absorptionsen. Herefter beregnes mængde udvasket enzym/protein i mg. De beregnede resultater findes i tabel 12.6.

Det konstateres at den største udvaskning sker fra prøve F5.8, hvilket er en prøve med lav PVK. Prøverne med høj PVK afgiver en mindre mængde enzym (protein). Målingen efter 3 døgns eksponering for F5.9 er af nogenlunde samme størrelsesorden som for F5 i den første serie målinger af enzymudvaskning (protein).

Tabel 12.6 Beregnede resultater for udvasket mængde protein og proteinindhold i malingfilmen.

Prøver	Udvasket mængde protein (mg) Efter eksponeringstid i døgn				Mængde protein i malingfilm (vægt-%) Efter eksponeringstid i døgn				
	1	3	7	15	0	1	3	7	15
Maling									
F5.8	0,51	1,13	1,48	1,84	0,79	0,70	0,60	0,54	0,48
F5.8	0,64	1,20	1,59	2,03	0,79	0,68	0,60	0,53	0,46
Gns	0,58	1,16	1,54	1,94	0,79	0,69	0,60	0,54	0,47
F5.9	0,25	0,48	0,88	1,28	0,61	0,59	0,57	0,54	0,50
F5.9	0,24	0,49	0,93	1,31	0,61	0,59	0,57	0,53	0,49
Gns	0,25	0,48	0,90	1,30	0,61	0,59	0,57	0,53	0,50
F5.10	0,25	0,52	0,92	1,43	0,59	0,58	0,56	0,54	0,50
F5.10	0,30	0,60	1,05	1,49	0,59	0,57	0,55	0,52	0,49
Gns	0,28	0,56	0,98	1,46	0,59	0,58	0,56	0,53	0,49
F5.11	0,30	0,57	0,90	1,16	0,78	0,70	0,63	0,55	0,48
F5.11	0,35	0,61	0,92	1,21	0,78	0,67	0,58	0,49	0,39
Gns	0,32	0,59	0,91	1,19	0,78	0,68	0,61	0,52	0,44

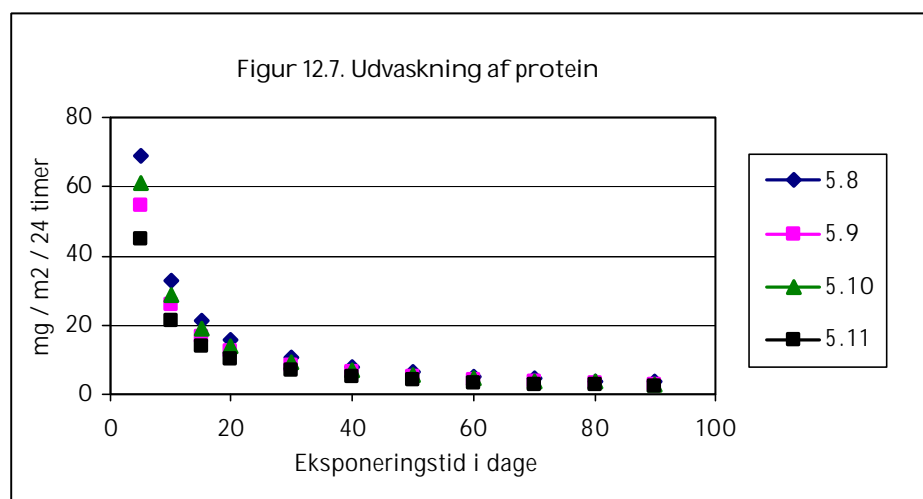
I figur 12.8 kan det tydeligt ses at F5.8 med lav PVK udviser en hurtig udvaskning af protein i de første døgn og at udvaskningen herefter formentlig går ned på et mere konstant niveau. De andre malinger udviser en lavere udvaskning af protein i starten af udvaskningsforløbet.



Da Alcalase udvaskningen kunne udtrykkes som logaritmiske regressioner, er den samme metode testet her. Resultatet for regressionsanalysen kan ses i tabel 12.7 .

Prøve	Ligning	R ²
F5.8	$y = 0,4958\ln(x) + 0,5901$	0,9988
F5.9	$y = 0,3919\ln(x) + 0,1691$	0,9619
F5.10	$y = 0,436\ln(x) + 0,1921$	0,9614
F5.11	$y = 0,3218\ln(x) + 0,2908$	0,9889

Ved at anvende ligningerne i tabel 12.7 kan protein udvaskningen evalueres. Resultatet kan ses i figur 12.9 hvor det kan ses at udvaskningen af protein efter 2 måneder er meget lav.



11.7 Samlet vurdering af udvasning af enzym

For at få et bedre overblik over sammenhæng mellem de opnåede resultater for 2. serie er der lavet en tabel med nøgledata, tabel 12.8. Umiddelbart kan det konstateres at der har været stor forskel i tykkelse af malingslaget ved udvaskningsforsøgene. Denne forskel burde ikke have nogen større betydning for resultaterne i starten af udvaskningsforløbet, da arealet og transporten af enzym til overfladen må være de vigtigste parametre. Hertil kommer at når malingen påføres ved dypning vil det være nødvendig at påføre flere gange hvis en bestemt lagtykkelse skal sikres eller også skal malingen påføres ved samme viskositet.

Der ser ud til at være en sammenhæng mellem udvasning af protein og vandoptagelse i malingsfilmen, hvor et større vandoptag fremmer udvaskningen. Ved måling af udvasning af Alcalase er resultatet mere usikkert. Det lader til at de målte mængder Alcalase er for lave for to af malingerne, mens proteinmålingen tilsyneladende viser en større udvasning. Dette kunne tyde på at eksponeringsintervallerne burde være længere for disse to formuleringer ved måling af enzymaktivitet. Faktisk er det en eksperimentel vanskelighed at enzymaktivetsmålingen bør foregå indenfor et snævert koncentrationsinterval, hvilket betyder at eksponeringsintervallet skal tilpasses dette.

Der er kun foretaget proteinmålinger i 15. døgn, og i dette tidsrum er der ikke opnået en konstant hastighed med hensyn til udvasning. Det kan dog konstateres at når den første hurtige udvasning er overstået, bliver udvaskningsforløbet mere parallelt for alle fire prøver.

Enzymaktiviteten aftager stadig efter 31 døgn. Dette kan tolkes som at enzymets transporthastighed til overfladen har betydning for hastigheden hvormed enzymet udludes. Dette kan få betydning for enzymets langtidseffekt.

I den første serie målinger (initialt) ser der ud til at være en sammenhæng mellem udvaskning af Alcalase kontra udvaskning af samlet mængde enzym for de fire testede malinger (1 opløsningsmiddelbaseret og 3 vandfortyndbare), hvilket ikke kan konkluderes i nr. 2 måleserie med 4 varianter af den opløsningsmiddelbaserede maling. Samtidig må det konstateres at i den første serie var PVK høj for alle prøver.

Ved måling af enzymaktivitet fås ingen udvaskning af Alcalase i F5.8 og F5.11, men måler man på protein fås en hurtig udvaskning i starten af eksponeringen for F5.8 og F5.11. Dette kan skyldes problemstillingen omkring enzymaktivitetsbestemmelsen (Alcalase) er usikker i det lave koncentrationsområde. Man kan heller ikke udelukke at udvaskningshastigheden for de forskellige enzymer kan være forskellig eller at de forskellige enzymer har forskellig affinitet til pigment respektive binder.

Alcalase analysen antyder at efter 3 måneder er udvaskningen reduceret kraftigt. Om enzymet har den ønskede antibegroningseffekt må således afhænge af om transporten af enzym til overfladen er tilstrækkelig. De målte værdier for enzymaktivitet for F.8 og F.11 bør ikke tillægges alt for stor værdi, da enzymaktiviteten er meget lav og absorbanserne ligger under det optimale måleområde ifølge referencekurven, hvilket betyder at analyseusikkerheden bliver stor.

Tabel 12.8 Sammenligning af vandoptagelse og udvaskning af Alcalase.

Prøve	Tørstof (vægt-%)	Pigmentvolumenkonzentration (%)	Pigment	Malinglag tørt (g)	5% Enzymopløsning, protein tilsat (mg) / (g/m ²)	3% Alcalaseopløsning tilsat (mg) / (g/m ²)	Udvaskning af Alcalase produkt i mg/m ² (60/90 dage)	Udvaskning af proteini mg/m ² (30/60 dage)	Vandoptagelse efter 10 døgn (vægt-%)
F5.8	55,5	44,0	TiO ₂	0,62	4,8 / 3,0	33,3 / 20,8	-	10, / 5	62,4
F5.9	71,5	53,0	TiO ₂	1,14	7,0 / 4,4	47,8 / 29,9	72 / 48	8 / 4	34,8
F5.10	73,5	52,0	TiO ₂ +ZnS	1,46	8,7 / 5,4	59,7 / 37,3	53 / 35	9 / 5	31,8
F5.11	56,0	43,0	TiO ₂ +ZnS	0,35	2,7 / 1,7	18,9 / 11,8	-	7 / 3	61,3

Det kan konkluderes at begge former for enzymanalyser fungerer rimeligt, men at der ikke nødvendigvis er umiddelbar sammenhæng mellem de to typer af udvaskningsresultater.

Endelig er erfaringen med analyse af enzymaktivitet og proteinudvaskning at det bør overvejes at videreudvikle målemetoderne, hvor et større veldefineret areal af maling eksponeres i en større mængde buffer. Resultaterne er dog tilstrækkelige til at vurdere størrelsesordenen for udvaskningen af Alcalase og protein fra malingsfilm.

12 Påførings- og filmegenskaber

12.1 Påføring med malerrulle

For at bestemme påføringsegenskaberne for prøverne mærket F5.8 til F5.11 påførtes de på matterede akrylplader med malerrulle med korte fibre (ca. 4-5 mm). Alle 4 prøver var nemme at arbejde med og sammenflydningen var pæn for alle prøver. Laboratorieforsøgene understøttes af tidligere udførte forsøg på sejlbåde af typen Spækhugger hvor et tilsvarende produkt F5.0 blev påført 15 både. Tilbage meldingen fra de deltagende sejlere var at de var meget nemme at arbejde med og lettere at påføre end de kommercielle produkter.

12.2 Slibbarhed

Der er udført slibeforsøg på prøverne mærket F5.8 til F5.11 med slibepapir af typen "Dragon 122" P150. Som reference blev brugt et kommercielt produkt. Prøverne og referencen blev påført på matterede akrylplader med lakpåfører, spalteåbning på 240 µm. Efter 1 døgn's tørring ved stuetemperatur blev både prøver og reference håndslæbet med "Dragon 122" P150. Ved visuel bedømmelse af sliberesultatet kunne det konstateres at prøver og reference afsatte samme mængde maling i slibepapiret.

12.3 Overmaling

Der er udført overmaling på en kommerciel primer med prøve mærket F5.11. Befugtning og vedhæftning var tilfredsstillende. Laboratorieforsøgene understøttes af tidligere udførte forsøg på sejlbåde af typen Spækhugger hvor et tilsvarende produkt F5.0 blev påført på 15 både. Tilbage meldingen fra de deltagende sejlere var, at der ikke var problemer ved påføring ovenpå "gamle" kommercielle produkter.

12.4 Filmkvalitet

Der er udført evaluering af overfladerne hos prøver med tør film af mærket F5.8 til F5.11. Den tørre malingsfilm blev undersøgt i stereomikroskop ved 25 ganges forstørrelse. Alle filmoverflader var pæne og jævne, dog var der enkelte lufthuller i prøverne fremstillet hos EnPro, men der var ikke hul igennem til underlaget. Resultatet af bedømmelsen ses i tabel 13.1.

12.5 Mekaniske egenskaber

12.5.1 Tørring

Prøverne mærket F5.8 til F5.11 indeholder organisk opløsningsmiddel og er fysisk tørrende. Det betyder at når det organiske opløsningsmiddel er fordampet er malingen tør. Malingerne, med de anvendte opløsningsmidler, er overfladetørre efter 1 til 2 timer og gennemtørre efter 4 til 5 timer ved

stuetemperatur. Dette svarer i stort set til det kommercielle produkt der er sammenlignet med.

12.5.2 Pendulhårdhed

Prøverne mærket F5.8 til F5.11 og en kommerciel reference blev påført på mattede akrylplader med lakpåfører med spalteåbning 240 µm. Efter konditionering på mindst 4 uger i klimarum ved 23±2°C og 50±5% RH blev prøvernes hårdhed målt med König Albert Pendul efter ISO standard 1522-73. Apparatet består af et pendul der øverst er forsynet med 2 stålkugler og nederst med en viser. Stålkuglerne anbringes på malingen og pendulet sættes i svingning. Hårdheden, der opgives i sekunder, bestemmes ved at måle hvor mange sekunder malingen er om at "dæmpe" et udsving på 3° (König Albert grader). Der er udført trippel bestemmelse for hvert produkt.

Dæmpningstiden er således et udtryk for filmens hårdhed, hvor en kort dæmpningstid er udtryk for en blød film og en lang dæmpningstid er udtryk for en hård film.

Prøve nr.	Filmens udseende Stereomikroskop 25 x	Filmtykkelse		Hårdhedsmåling				Standard-afvigelse
		våd (µm)	Beregnet, tør (µm)	I	II	III	Gennemsnit	
				Dæmpningstid (sekunder)				
Reference	Jævn film	240	100	90,9	88,1	90,6	90	1,6
F5 2001	Jævn film, få lufthuller	240	100	48,2	46,0	44,8	46	1,7
F5.2	Jævn film, få lufthuller	240	100	77,5	76,0	78,8	77	1,4
F5.3	Jævn film, få lufthuller	240	100	76,0	77,2	76,2	76	0,7
F5.4	Jævn film, få lufthuller	240	100	77,1	78,0	78,1	78	0,5
F5.5	Jævn film, få lufthuller	240	100	74,3	72,0	71,8	73	1,4
F5.5a	Jævn film, få lufthuller	240	100	77,4	82,0	80,2	80	2,4
F5.6	Jævn film, få lufthuller	240	100	64,3	66,9	68,7	67	2,2
F5.8	Jævn film, få lufthuller	240	100	90,7	88,5	91,6	90	1,6
F5.9	Jævn film, få lufthuller	240	100	82,4	89,5	87,4	86	3,7
F5.10	Jævn film, få lufthuller	240	100	83,4	80,6	81,7	82	1,4
F5.11	Jævn film, få lufthuller	240	100	86,4	84,7	90,6	87	3,0

12.5.3 Vedhæftning til underlag ved 23° og 5°C

Prøverne mærket F5 2001 samt F5.8 til F5.11 og en kommerciel reference blev påført på mattede akrylplader med lakpåfører med spalteåbning 240 µm. Vedhæftningen til underlaget blev undersøgt ved gittersnit ifølge ISO 2409. Tørretid minimum 4 uger i klimarum ved 23±2°C og 50±5% RH inden prøvningen. Der skæres 6 parallelle linier med 2 mm afstand og henover dem i en vinkel på 90° skæres endnu 6 linier således der dannes 36 små kvadrater. Overfalden børstes med en blød børste flere gange frem og tilbage i diagonalernes retning. Kvadraternes udseende bedømmes herefter på baggrund af et klassifikationsskema i prøvningsstandard ISO 2409, se tabel 13.2. Der blev udført enkeltbestemmelse for hvert produkt.

For at undersøge temperaturens indvirkning på vedhæftningen blev der udført gittersnit ved 23°C og efter 1 døgn ved 5°C. Målingen ved 23°C blev udført i klimarum, mens målingen ved 5°C blev udført straks efter udtagning fra køleskab. Vedhæftningen til underlaget var generelt dårlig for samtlige prøver inklusive referencen.

Prøve nr.	Bedømmelse ved 23°C	Bedømmelse efter 1 døgn ved 5°C
Reference	5	5
F5 2001	2-3	5
F5.8	4	5
F5.9	5	5
F5.10	5	5
F5.11	4-5	5

Evalueringen angiver et tal der henviser til hvor godt malingen hæfter til underlaget i % af gitter arealet

0 = ingen vedhæftningssvigt

1 = små flager af malingen slipper, <5% af arealet er påvirket

2 = flager af malingen efter snitlinier eller hjørner slipper (>5% men <15%).

3 = flager går af langs kanterne delvist eller i hele strimler og/eller dele eller hele kvadrater slipper i gittermønstret (>15% men <35%).

4 = flager går af langs kanterne i hele strimler og/eller kvadrater slipper delvist eller helt (>35% men <65%).

5 = alt der ikke kan henføres til klassificering 4.

12.6 Foreløbige konklusioner vedrørende filmegenskaber

Generelt er prototypemalingerne F5.8-11 nemme at påføre. Slibe, film og tørringsegenskaber er svarende til kommercielle produkter af samme type (binder og opløsningsmiddel).

Det er tidligere vist at halvdelen af enzym mængden (Alcalase) udvaskes fra malingsfilmen i løbet af 2-4 måneder. Udsætning af paneler viser at enzymets effekt aftager efter 4 måneder. Dette kan fortolkes som at udnyttelsen af enzymet aftager alt efter hvor langt nede i malingslaget enzymet sidder. Med andre ord det er nødvendig med en vis udvaskning af enzym for at opretholde en antibegroningseffekt. Dette kunne tyde på at en selvpolerende maling ville være mere effektiv da tilgangen af enzym til overfladen ville være større.

Hertil kommer at de afprøvede enzymer udviser en begrænset effekt i forhold til alger. Disse er dog rimeligt nemme at vaske af efter optagning af panelerne. Afprøvning af andre typer af enzymer for at forhindre algebegroning er under afprøvning.

13 Udsætning af paneler i sæsonen 2002

Prototypemalingerne F5.8 til F5.11 er anvendt til udsætning af standardpaneler i en række havne i samarbejde med Dansk Sejlunion. De fem havne var Struer, Marselisborg, Horsens, Helsingør og Kalvehave. Dansk Sejlunion har udsat paneler på "rafts" (ramme med typisk 15 paneler der er malet med forsøgsmalingerne) fra flere leverandører, herunder både testprodukter og kommercielle produkter. I bilag D er der lavet en tabel over hvilke paneler der kan ses på "raftene". Endvidere er der udvalgt et antal billeder der viser panelerne før og efter udsætning for to havne, Helsingør og Kalvehave. Dette for at vise resultater fra en havn med begroning og en havn med mindre begroning. I de øvrige tre havne er der generelt kraftig begroning.

13.1 Evaluering af resultater november 2002

Resultaterne af udsætning af paneler i 2002 er her koncentreret om vurderingen af prototypemalingerne F5.8-F5.11, samt en kommerciel reference med "højt" kobberindhold. Malingsfilmens udseende før udsætning kan ses i tabel 13.1. Bedømmelsen af begroning på malingsfilmene fra denne "raft"-test er baseret på en bedømmelse af digitale billeder der er taget i juni, august og november 2002 (ved optagning inden spuling). Resultaterne fra denne bedømmelse kan ses i tabel 14.1. Bilag D indeholder en oversigt med panelernes placering på rafts samt billeder udvalgt fra de to havne der er refereret til.

Bedømmelsen af begroningen viser at der kun er grøn algeslim på prøvepanelerne i Helsingør havn indenfor de første 4 måneders eksponering. Herefter begynder rurer at sætte sig på prøvepanelerne. Tilsvarende består begroningen fra juni til november i Kalvehave havn hovedsagelig af brun algeslim, der var nogenlunde konstant i perioden. Der var kun enkelte rurer på prøvepanelerne ved hjemtagningen i november fra Kalvehave havn. Billederne i bilag D viser endvidere panelerne efter optagning og afvaskning, hvilket giver et mere positivt resultat sammenlignet med bedømmelsen i tabel 14.1, hvor referencen gennemgående klarer sig bedre end prototypemalingerne.

Generelt viser denne undersøgelse at beskyttelsen mod begroning af rur bør forlænges for prototypemalingerne med et par måneder, hvilket indebærer justering af malingens formulering. Endvidere bør beskyttelsen mod alger forbedres om end denne ikke er lige så problematisk som rurer og muslinger.

Havn	Helsingør havn					Kalvehave havn		
	Prøve nr.	Juni 2002	August 2002	November 2002	November 2002 efter vask	Rur % af det malede areal	Juni 2002	August 2002
F5.8 -enzym	2/ grøn algeslim	3/ grøn algeslim	5/ rur	2-3	5	3/ brun algeslim	2-3/ brun algeslim	3/ brun algeslim
F5.8	2/ grøn algeslim	3-4/ grøn algeslim	5/ rur	2-3	10	3/ brun algeslim	2-3/ brun algeslim	2-3/ brun algeslim
F5.9	2/ grøn algeslim	3/ grøn algeslim	4/ rur	1-2	5	3/ brun algeslim	3/ brun algeslim	3/ brun algeslim
F5.10	2/ grøn algeslim	4/ grøn algeslim	3/ rur	1	3	3/ brun algeslim	3/ brun algeslim	4/ brun algeslim
F5.11-enzym	2/ grøn algeslim	3/ grøn algeslim	5/ rur	2-3	10	3/ brun algeslim	3/ brun algeslim	4/ brun algeslim
F5.11	2/ grøn algeslim	4/ grøn algeslim	5/ rur	2-3	10	3/ brun algeslim	3/ brun algeslim	3 / brun algeslim
F5.11+primer	3/ grøn algeslim	5/ grøn algeslim	5/ rur	4	-	3-4/ brun algeslim	3-4/ brun algeslim	4/ brun algeslim
Reference (Kobberholdig)	0	0	2	2	0	0	0	1

Samtlige data findes i bilag D.

Evalueringen angiver et tal der henviser til hvor stort et areal i % af malingen der er begroet

0 = ingen begroening

1 = 10% af arealet er begroet

2 = 30% af arealet er begroet

3 = 60% af arealet er begroet

4 = 80% af arealet er begroet

5 = 100% af arealet er begroet

Kommentaren efter tallet viser hovedtypen af begroeningen

14 Eksponering i havvand 2003

14.1 Valg af maling til eksponeringsforsøg

Dansk Sejlunion har foretaget "raft" prøvninger i 2002 i 5 havne, se afsnit 14. I denne forbindelse er et antal af projektets prototypemalinger blevet testet. På baggrund af de resultater der var opnået med hensyn til begroning på "rafts" i sæsonen 2002 er den bedst fungerende prototypemaling uden Zink (F5.9) udvalgt til pilottest på sejlbåde i 2003.

Der er i perioden indledt et udviklings samarbejde mellem BioLocus ApS og Jotun A/S. De pilotfremstillede produkter er fremstillet på baggrund af EnPro's prototyperecepter og efter anvisning fra EnPro. Jotun har således efter aftale produceret F5.9 samt en selvpolerende prototypemaling.

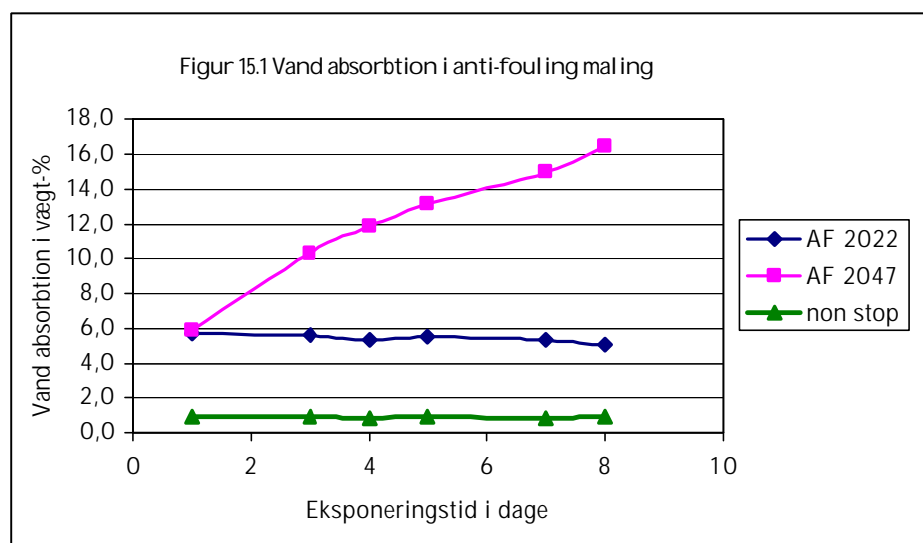
Tabel 15.1 Produkter til eksponering i havvand 2003

Produkt	Beskrivelse	Tørstof (vægt-%)
AF 2022	Selvpolerende produkt	61
AF 2047	Recept F 5.9 med Jotuns råvarer	72
Non-Stop	Kommercielt kobber produkt	-

De producerede malinger er blandt andet testet med hensyn til vandoptag og udvaskning af Alcalase. Disse prøvninger er udført samtidig med afprøvningen i havvand er planlagt og påbegyndt.

14.1.1 Vandoptag

Ved undersøgelse af vandoptag, udført som beskrevet i afsnit 11.1, er der tilsat 5 % Alcalase til AF2022 og AF2047. Det kommercielle produkt har det laveste vandoptag, hvor den selvpolerende har et lidt højere men ellers tilsvarende vandoptag. Den hårde type AF 2047 har et højere vandoptag, men lidt lavere end produktet F5.9.



14.1.2 Udvaskning af enzym

Denne test er modificeret i forhold til tidligere analyser. Dette for at få mulighed for at vurdere hvad det betyder hvis en båd der er nymalet bliver stående på land i længere tid og derved bliver udsat for længere tids UV-lys.

Malingsprøverne er ved denne test påført en plasticfilm (Hostaphane) med en 240 µm applikator. De tørre prøver blev klippet i firkanter 4x4 cm. Et antal af prøverne blev herefter eksponeret med UV-lys i en Suntest Hanau. Der er også tilsat kogt Alcalase til nogle prøver for at have en reference hvor aktiviteten må forventes at være ødelagt.

Suntesten har et eksponeringsareal på 20x28 cm. Holdbarheden i relation til lysægthed er tidligere undersøgt, hvor en ca. holdbarhed i forhold til uldstandarder (British Standard 1006 nr. 1-8) er undersøgt, (Hansen, 1964). For at opnå en eksponering i UV-lys der svarer til ca. 1 måned udendørs er det nødvendig at opnå trin 4 ifølge uldstandarden. Det er muligt at forlænge forsøget for at se hvordan enzymaktiviteten påvirkes af sollys og temperatur med tiden.

Tabel 15.3 Forslag til lysægthed for uldstandarderne 1-8.

Uldstandard / Trin	1	2	3	4	5	6	7	8
Forslag til holdbarhed	1 dag	1-3 dage	Ca. 1 uge	2-4 uger	1-2 måneder	2-5 måneder	6-12 måneder	Ca. 2 år
UV-eksponering udført (timer)				52	117	160		

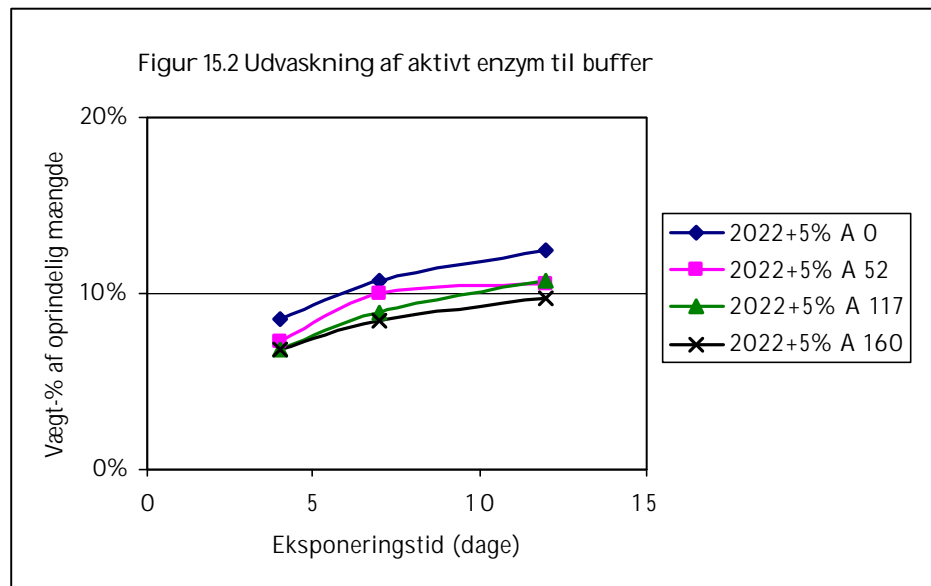
Både eksponeret og ikke eksponeret malingsfilm blev rullet sammen som en tube og sat ned i prøveglas. Malingsfilmen placeredes på indersiden i forhold til glasset for at få maksimal eksponering mod bufferen. På denne måde blev arealet holdt konstant i forhold til tidligere malinger, men buffermængden er øget til 6 ml.

Bufferen blev skiftet efter forskellige tidsintervaller hvorefter enzymaktiviteten blev målt, som beskrevet i afsnit 11.2. Bufferen skiftes normalt indtil at udludningen er konstant. Testen er udført som dobbeltbestemmelse. Gennemsnittet for udvaskning af enzym (Alcalase) er udført over 12 dage og kan ses i tabel 15.4.

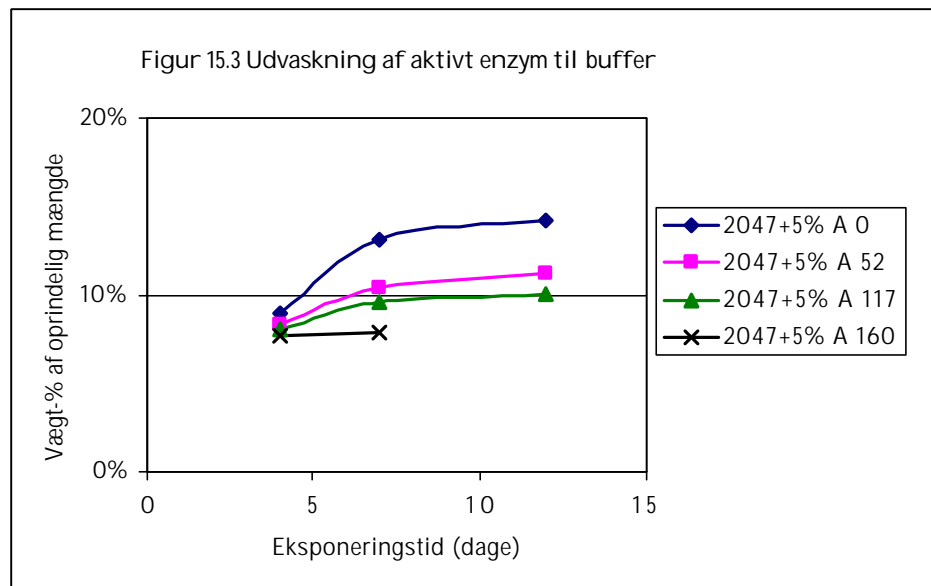
Tabel 15.4 Udvasket mængde enzym (vægt-%) fra malingsprøverne

Prøve	UV-eksponering (timer)	Udvasket mængde (vægt-%)		
		Efter 4 dage	Efter 7 dage	Efter 12 dage
2022+5% A	0	8,52	10,72	12,47
2022+5% A	52	7,24	9,97	10,56
2022+5% A	117	6,78	8,94	10,76
2022+5% A	160	6,78	8,46	9,72
2022+5% boiled A	0	-2,52	-	-
2022+5% boiled A	52	-3,23	-	-
2022+5% boiled A	117	-3,23	-	-
2022+5% boiled A	160	-3,00	-	-
2047+5% A	0	8,98	13,17	14,26
2047+5% A	52	8,37	10,43	11,23
2047+5% A	117	8,07	9,62	10,03
2047+5% A	160	7,68	7,85	-

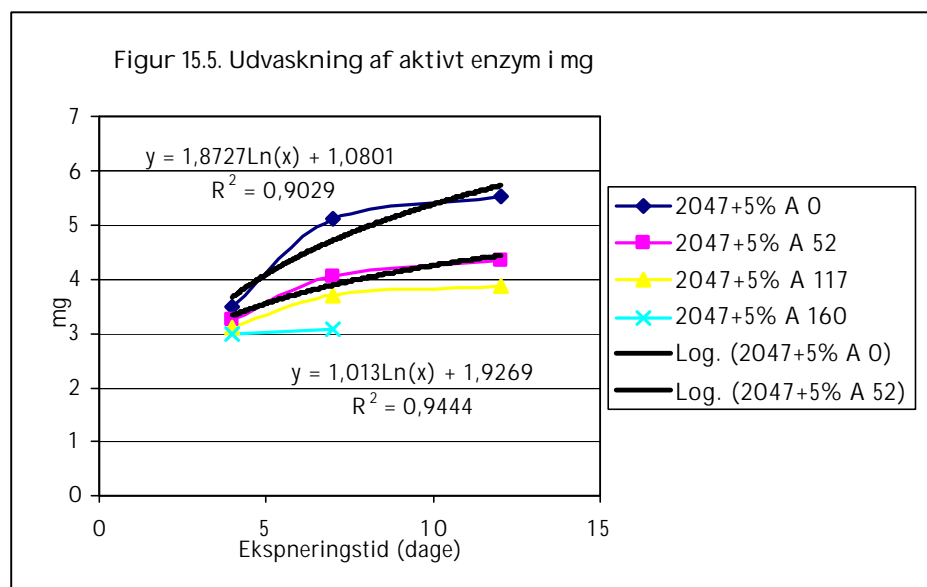
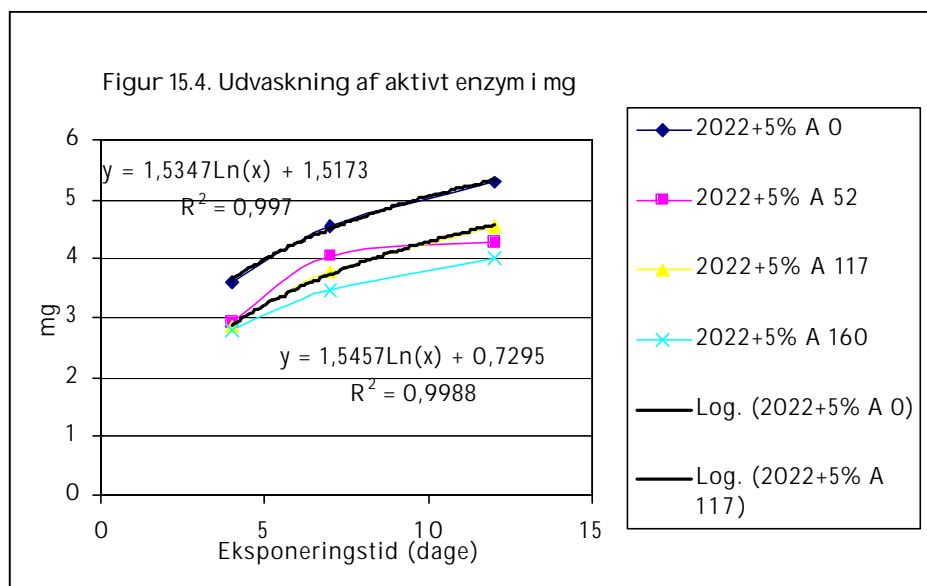
Figur 15.2 viser resultaterne fra forsøgene med enzymudvaskning for produktet AF 2022. Målingerne på prøver der indeholder kogt Alcalase giver meget lav absorbans hvilket medfører at tallene bliver negative og ingen aktivitet kan måles.



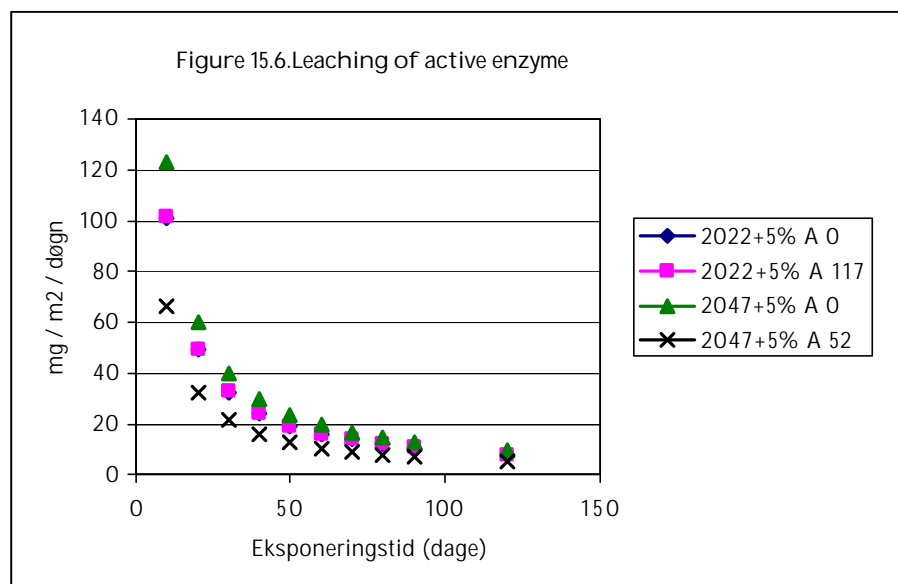
Figur 15.3 viser resultaterne fra forsøgene med enzymudvaskning for produktet AF 2047. I dette tilfælde ses en klar tendens til at øget UV-eksponering medfører en reduceret enzymaktivitet.



Der er forsøgt at bestemme udvaskningen af enzym i mg som funktion af tiden. Regressionerne, der er lavet for reference prøven (ikke UV-belyst) samt for en prøve der er eksponeret, er vist i figur 15.4 og 15.5.



Regressionerne er anvendt til at beregne udvaskningen af aktivt enzym i mg / m² / døgn. Resultatet af disse beregninger ses i figur 15.6. Det bør bemærkes at udvaskningsraten generelt er lav og at forsøgene er udført over kort tid, hvilket medfører en relativt stor usikkerhed. Kurvernes udseende er dog i overensstemmelse med tidligere målinger.



14.1.3 Kommentarer til måling af vandabsorption og enzymaktivitet

Vand absorptionen er højere for AF 2047 end AF 2022. Det bør bemærkes at AF 2047 gulner hurtigt med tiden. UV eksponering fremmer endvidere gulningen og prøven bliver sprød. Denne effekt er ikke tidligere set med F5.9, hvilket tyder på at nogen råvarer ikke er identiske.

UV-eksponering ser ud til at påvirke udvaskningen af aktivt enzym. Effekten er ikke meget stor for AF 2022, hvor reduktionen i udvaskning af aktivt enzym ses efter en eksponeringstid med UV-lys på 52 timer (svarende til 2-4 uger), men hvor yderligere eksponering ikke ser ud til at give nogen signifikant effekt. Prøven AF 2047 udviser en signifikant reduktion i udvasket aktivt enzym efter eksponering for UV-lys, men denne prøve er ikke helt så god, hvilket ses på tendensen til gulning. Det er derfor svært at drage en klar konklusion. AF 2022 bliver kraftigt påvirket af bufferen med tiden, hvilket medfører at filmen opløses efter 20 dage. Målinger af enzymaktivitet på prøver med kogt Alcalase viser en meget lav absorbans, og intet aktivt enzym kan måles.

15 Praktisk afprøvning – forløbsbeskrivelse

Dansk Sejlunion har som led i projekt om udvikling og afprøvning af enzymbaseret bundmaling stået for den praktiske afprøvning af to miljøvenlige bundmalingsprodukter fra firmaet BioLocus. Malingerne er udviklet i et samarbejde mellem Jotun A/S og BioLocus ApS. I alt 19 lystbåde fordelt på fem forskellige lystbådehavne i Danmark har deltaget i afprøvningen. De fem testhavne er Helsingør, Kalvehave, Horsens, Marselisborg og Skive. Havnene er valgt for nogenlunde at dække den variationen i begroningstyper og mængder, der findes i de danske farvande.

Produktet AF 2047 (hård bundmaling) har været afprøvet på ¼ af bådene i hver havn, og AF 2022 (selvpolerende bundmaling) har været afprøvet på de resterende både.

15.1 Forbehandling

Der blev som udgangspunkt udleveret en 1-komponent primer til de deltagende bådejere. Deltagerne påførte selv denne primer forud for påføringen af testmalingen. Primerens funktion var, at forsegle tilbagesiddende gammel bundmaling. Herved sikres et ensartet udgangspunkt for testen, samt at den gamle bundmaling ikke influerer på testmalingernes virkning.

15.2 Referencemaling

Primer og testmaling samt en referencemaling fra Jotun (almindelig kobberbaseret bundmaling, "Non-stop") blev påført af bådejerne med rulle.

Referencemalingen blev påført på et mindre areal af båden midtskibs for at kunne sammenligne virkning.

15.3 Udlevering af maling

Primer, testmaling og referencemaling blev udleveret medio marts til de deltagende testsejlere. Der blev også udleveret malerruller og bakker.

15.4 Påføring af maling

Der skulle efter forskrifterne påføres ét lag testbundmaling.

15.5 Søsætning

Hovedparten af bådene er søsat i den normale periode fra medio april til medio maj.

15.6 Spørgeskemaer

Deltagerne har udfyldt to spørgeskemaer i løbet af testen. Dels et påføringskema hvor bådejerne bl.a. skulle vurdere, hvordan malingen var at arbejde med. Dels et resultatskema der skulle besvares ved sæsonens afslutning. Bådejerne skulle udfylde dette skema inden bådene blev taget på land. Heri skulle de beskrive deres oplevelser med testmalingen, herunder om testmalingen har været anderledes at sejle med end normalt, om de har observeret begroning i vandlinien, om de har mærket fartreduktion m.m. Svarprocenten for både påførings- og resultatskema var 95%.

15.7 Inspektioner

Dansk Sejlunion har foretaget 3 inspektionsrunder i løbet af sejlsæsonen 2003:

4. runde – ultimo juni (her blev der taget 7 både op i 4 ud af 5 testhavne)
5. runde – august/september (her blev i alt 8 både inspiceret i 3 ud af 5 testhavne)
6. runde – oktober/november (her er alle både inspiceret i forbindelse med vinteroptagning).

Ved første og anden inspektion blev testbådene fotograferet og der blev udfyldt skemaer over begroningstyper og -mængder observeret på de enkelte både. Inspektioner blev udført for at få en indikation af hvordan begroningen udviklede sig på hhv. test- og kontrolmalingerne.

Forud for tredje inspektionsrunde informerede testsejlerne Dansk Sejlunion om tidspunktet for optagning af båden. Bådene blev også ved den lejlighed fotograferet og begroningstyper og -mængder noteret.

16 Kvantificering af begroning

Under inspektionerne er de enkelte begroningstyper observeret på testbådene forsøgt kvantificeret i forhold til, hvor stor en andel af de enkelte begroningstyper, der dækkede skroget. Nedenstående boks viser, hvordan begroningen er kvantificeret.

Begroning	Ca. %-andel af skroget dækket af begroning	Kategori
Ingen bevoksning	0%	0
Lidt bevoksning	0 - 5%	1
En del bevoksning	5 – 25%	2
Meget bevoksning	25 – 50%	3
Særdeles meget bevoksning	50 - 100%	4

Tabel 1. Skema til kvantificering af begroning anvendt i forbindelse med inspektioner.

16.1 Begroningstyper og mængder

De mest fremtrædende begroningstyper i de fem havne er:

- Slim
- Alger
- Rurer
- Mosdyr (Bryozoer)
- Søpunge (kun observeret i Marselisborg)

Det er i løbet af testen observeret, at begroningsintensiteten varierer meget i de fem testhavne. Med hensyn til rurer er yderpunkterne, som tidligere forsøg bekræfter Horsens og Kalvehave. I Horsens er der meget kraftig vækst med rurer og i Kalvehave kun meget få rurer. Omvendt er der dog i Kalvehave rimelig kraftig vækst med mosdyr. Hvad algebevoksningen angår, blev den kraftigste vækst observeret i Skive.

17 Resultater vedr. påføringsegenskaber

I det følgende præsenteres resultaterne fra den praktiske afprøvning af primer, BioLocus bundmalingerne AF2022 og AF2047 samt referencemaling. Præsentationen er overordnet opdelt i hhv. resultaterne vedr. påføring og resultater vedr. antibegroningsegenskaber (næste kapitel) herunder bådejernes vurdering af testbundmalingerne.

I Bilag E er alle deltagernes kommentarer til påføringsegenskaberne for hhv. primer, testbundmaling og referencemaling gengivet.

17.1.1 Primer

Alle der i påføringsskemaet har knyttet kommentarer til primerens påføringsegenskaber har været tilfredse. Mange anfører, at primeren er nem at påføre og dækker godt.

17.1.2 Testmalinger

17.1.2.1 Hård maling 2047

Kommentarerne til påføring af 2047 er lidt tvetydige. To ud af fire angiver, at den er let at påføre, hvorimod de to øvrige oplevede den som svær eller ikke let at påføre. Tre ud af fire oplevede, at malingen ikke dækkede ordentligt. Heraf anførte to at den virkede tyk. En enkelt påførte to lag for at sikre ordentligt dækning.

17.1.2.2 Selvpolerende maling 2022

Bådejerne er alle enige om, at den selvpolerende maling var svær at påføre og dækkede dårligt. Flere angiver, at den var klistret og klæbende at påføre.

17.1.3 Kontrolmaling (reference)

Kontrolmalingen er, som tidligere nævnt, en traditionel biocidholdig selvpolerende bundmaling baseret på kobber. Den er nem at påføre og dækker godt. En betegner den som normal at påføre. Flere oplevede dog malingen som meget tyndtflydende.

17.1.4 Opsamling - påføringsegenskaber

Primeren er uproblematisk at arbejde med og dækker godt. Der var generelt stor tilfredshed med påføringsegenskaberne.

Begge testmalinger oplevede deltagerne som problematiske at påføre, dog mest udtalt for den selvpolerende maling. Malingerne dækker ikke så godt og er svære at påføre. Malingerne er sandsynligvis for tyktflydende.

Referencemalingen anses for normal at påføre om end den tilsyneladende er lidt tyndtflydende.

18 Resultater vedr. antibegroningsegenskaber

I det følgende præsenteres resultaterne fra bådinspektionerne og fra bådernes vurdering af malingernes antibegroningsegenskaber.

I løbet af testen har flere bådere skrubbet eller vasket bunden fri for begroning en til flere gange i sæsonen. Begrundelsen har været nedsat fart, øget brændstofforbrug, begroning i vandlinien m.m.

Denne afvaskning betegnes som en fejlkilde i bedømmelsen af malingernes virkning, idet de enkelte inspektioner ikke giver et retvisende billede af malingernes reelle antibegroningsegenskaber. De både der ikke har været afvasket før vinteroptagningen eller mellem de enkelte inspektioner, har været tydeligt mere begroede i forhold til de både, der løbende er blevet vasket.

I følgende præsentation af resultaterne skelnes der derfor mellem både, der ikke har været afvasket eller berørt i bunden, og både, hvor begroning er blevet vasket/skrubbet af.

18.1 Udgåede både

Fem ud af 19 testbåde er i udgået af testen i løbet af sæsonen. Ifølge bådjerne pga. for kraftig og uacceptabel begroning. Det drejer sig om to i Skive (begge 2022) og to i Helsingør (en 2022 og en 2047). De udgåede både sejler alle kapsejlads. En sidste båd fra Horsens udgik i juni pga. salg.

18.2 Både der *ikke* har været afvasket

Ni ud af de i alt 19 både der deltog i testen gennemførte uden, at bunden blev vasket eller skrubbet i bunden mellem søsætning og inspektionstidspunktet. Alle de både der blev inspiceret i juni og august - på nær en - fik dog afvasket begroningen i forbindelse med selve inspektionen. Kun havnefogedens jolle i Horsens blev kortvarigt løftet op for inspektion i juni og søsat igen uden afvaskning.

I alt gennemførte 7 både, heraf er 4 motor- og speedbåde, uden at blive vasket i bunden. Billedet svarer til, hvad der er normal praksis, idet hovedparten af danske bådere, normalt ikke vasker bunden i løbet af sæsonen.

Det skal nævnes, at visse af de testsejlere der ikke afrensede begroning har tilkendegivet, at de havde behovet, men af hensyn til forsøget ikke vaskede bunden.

18.2.1 Første inspektion

Ved første inspektion i slutningen af juni/starten af juli blev i alt 7 både inspiceret, heraf havde 5 ikke vasket bunden forinden. I bilag B ses billeder af et udsnit af de 5 inspicerede både.

Som det fremgår, var testbådene i de tre havne: Skive, Marselisborg og Horsens godt begroede med slim og alger dog værst i Skive. Det gjaldt både på den selvpolerende 2022 og den hårde 2047 maling.

Kun i Horsens blev der ved første inspektion observeret rurer på testmalingerne. Bundene var til gengæld stort set dækket af de små kalkskaller, dog værst på 2047 malingen (se f.eks. nærbillede af roret på *Skagerak 21*).

På kontrolmalingerne blev der i alle havne kun observeret et slimlag af varierende udbredelse, men ingen øvrig begroning.

Første inspektion lå 4 til 8 uger efter søsætning for de viste testbådes vedkommende. Generelt må begroningen på dette tidspunkt i sæsonen siges at være på et højt niveau sammenlignet med kontrolmalingen.

18.2.2 Anden inspektion

Anden inspektion i slutningen af august/starten af september bekræftede billedet fra første inspektion. I alt blev 8 både inspiceret, heraf var 3 ikke rensede for begroning forinden. I bilag F under afsnittet "Anden inspektion" ses billeder af to af disse både.

Båden fra Skive malet med 2022 havde særdeles meget slim og alge bevoksning, men også en del rurer og muslinger. Vandlinien havde grønne algetråde.

Båden fra Helsingør var interessant, idet der var påført 2047 og 2022 på hhv. styrbord og bagbord side af skroget. Som det fremgår, er der tydeligt mest begroning på 2047. 2022 havde meget slim og en del alger, bryozoaer og rurer, men var i forhold 2047 rimelig pæn. Meget af malingen var imidlertid poleret af ind til gammel grøn biocidholdig bundmaling, da denne båd ikke var påført primer. De grønne områder var derfor pæne.

Generelt blev der ved anden inspektion i forhold til ved første observeret rurer på testmalingerne i Skive og Helsingør. Samtidig var det tydeligt, at 2022 meget let blev polerede af under normal sejlads.

18.2.3 Tredje inspektion - vinteroptagning

I forbindelse med vinteroptagningen i slutningen af oktober/starten af november havde 7 af de deltagende både som tidligere nævnt ikke vasket bunden i løbet af sæsonen.

Generelt havde de uberørte både ved sæsonens afslutning særdeles meget slim- og algebevoksning. På bådene i Kalvehave og Helsingør var bunden derudover belagt med bryozoaer (mellem 50-100%) og lidt rurer. Det skal

hertil nævnes, at testmalingerne særligt 2022 mere eller mindre var poleret af ved sæsonens afslutning.

Ses der på områder med tilbagesiddende testmaling, er det dog indtrykket, at mængden af rurer ved sæsonens afslutning her var relativ beskeden. Dette dog bortset fra Horsens, hvor testbådene (to motorjoller) var kraftigt dækket af rurer.

I bilag F under afsnittet ”Tredje inspektion – vinteroptagning” ses det på billederne af *IF’eren* fra Helsingør, at malingen stort set var poleret af (de grå områder = primer). Det er tydeligt at se, at malingen har en virkning på de områder hvor den sidder tilbage (de hvide områder). Disse områder er væsentligt mindre begroede. Denne båd var påført to lag bundmaling 2022, hvilket sandsynligvis forklarer, at der stadig er maling tilbage.

18.3 Både der *har* været afvasket

Tolv ud af de i alt 19 testbåde blev som tidligere nævnt skrubbet eller vasket for at fjerne generende begroning mellem inspektionerne og/eller i forbindelse med inspektionerne.

Ifølge disse bådejere var begroningsmængden på testmalingerne så uacceptabel, at jævnlige afrensninger var nødvendige. Det er specielt kapsejlere, der normalt er opmærksomme på bådens fart og manøvreringsegenskaber, som har foretaget afvaskningerne. Det skal nævnes, at 11 ud af de i alt 19 testsejlere anvender båden til kapsejlad (alm. klubkapsejladser).

Allerede inden første inspektion i slutningen af juni havde flere testsejlere været nødt til at fjerne begroning. I bilag F ses billeder af en båd fra Skive taget under første inspektion. Båden, der er påført 2047, blev rengjort med børste fra dækket to gange inden inspektionstidspunktet. Det ses tydeligt hvilke områder af bunden, som det er lykkedes vaske (den hvide vandrette stribe nederst på kølen er dog kontrolmalingen).

I bilag G ses også billeder af to både fra anden inspektion foretaget i slutningen af august/starten af september. Begge både er rimelig pæne, men har også kort tid forinden fået vasket generende begroning af. På båden fra Helsingør er det tydeligt at se, at malingen stort set er poleret/vasket af da bunden er meget grålig (primeren er grå).

Ved vinteroptagningen var de fleste tilbageværende både kraftigt begroede trods de gentagne afrensninger. Hovedparten af malingen var dog også forsvundet og begroningen sad overvejende direkte på primeren.

18.4 Generelt

18.4.1 Kontrolmaling

Generelt er der observeret en stor forskel på kontrol- og testmalingerne, dog tydeligst på de både, der ikke har været vasket. Denne forskel ses på en række af billederne i bilag F. Kontrolmalingen har været belagt med et slimlag, men stort set ikke yderligere begroning.

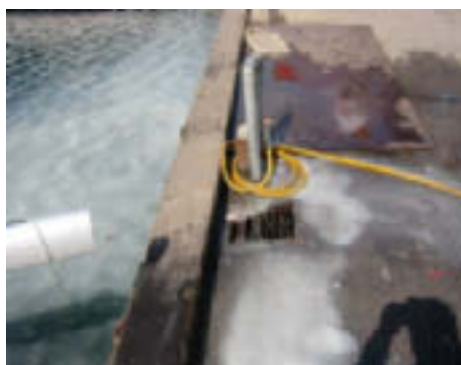
18.4.2 Fjernelse af begroning

I forbindelse med afvaskningerne under første og anden inspektion var det generelle indtryk, at begroningen var rimelig nem af vaske af. Med højtryksrensning, en blød børste eller skrubbe var det muligt at fjerne slim og alger. Rurer skulle dog fjernes med en spartel.

Visse af de uberørte både har dog været sværere at rengøre. I Kalvehave brugte en bådejere f.eks. 11 timer på at fjerne bevoksningen fra en lille 24 fods sejlbåd.

18.4.3 Afsmitning

Der er som det fremgik af inspektionerne tendens til, at malingerne smitter af. Dette er mest udtalt på 2022. På flere testbåde var malingen som nævnt pletvis eller næsten helt poleret af. 2047 havde mindre tendens til at smitte af under normal sejlads. Selv på uberørte både forsvandt malingen som følge af almindelig sejlads. En motorbåd fra Kalvehave med 2022 havde således ingen bundmaling tilbage ved sæsonens afslutning.



Vaskevand fra afvaskning af testbåd i Helsingør 19/6-03 påført 2047.



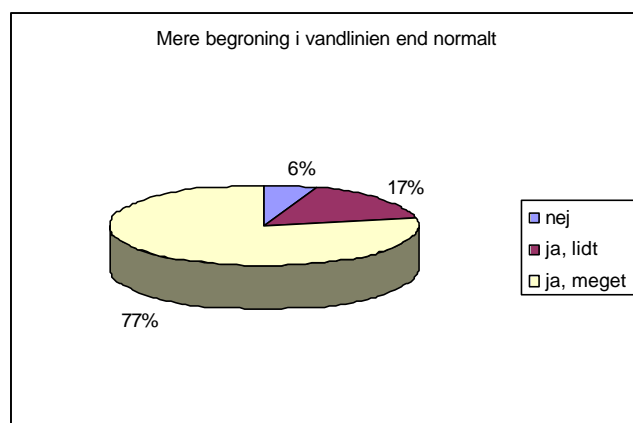
Afvaskning af IF'er 14/11-03 i Helsingør påført 2022. På få områder findes tilbagesiddende bundmaling (hvide områder). Maling og begroning spules nemt af ind til primeren (grå områder).

Afsmitningen sås særligt tydeligt på land, hvor begge malinger smittede af under afvaskning (se billeder ovenfor). I den forbindelse betegnede en af testsejlerne 2022 malingens konsistens som "flødeskum".

18.5 Testsejlernes vurdering

18.5.1 Bådejernes oplevelser af begroning

I spørgeskemaet skulle bådejerne beskrive, om de havde oplevet mere begroning i vandlinien end normalt og i givet fald fra hvilken måned. Som det fremgår af diagrammet til højre observerede 77% af



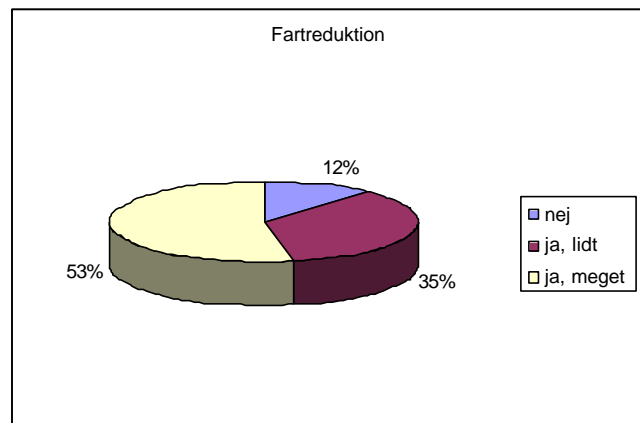
testsejlerne meget mere begroning i vandlinien end normalt. 17% oplevede lidt mere begroning end normalt, og det må derfor konstateres at malingerne ret entydigt bekræfter mere i vandlinien, end hvad testsejlerne normalt oplever. Ikke alle har opgivet fra hvilken måned de observerede mere begroning i vandlinien, men hovedparten af dem der svarede angav, at de allerede fra juni måned konstaterede begroningen. To oplevede det fra maj måned, to fra april og én fra august måned.

Kun en testsejler havde ikke oplevet mere begroning i vandlinien. Denne båd - en speedbåd (gummibåd med glasfiber skrog) - havde ved anden inspektion stort ingen nævneværdig begroning på skroget. Dette skyldes formentlig, at båden med sin høje fart (15 knob) har kunne sejle begroningen af, eller at de store gummipontoner har skygget for lyset og derved muligvis mindsket begroningen.

18.5.2 Fartreduktion

I resultatskemaet skulle bådejerne også oplyse om de gennem sæsonen havde mærket en reduktion i bådens fart.

Flere testsejlere henvendte sig i løbet af sæsonen til Dansk Sejlunion og beklagede sig over begroningsmængden, nedsat fart og øget brændstofforbrug.



På spørgsmålet om man gennem sæsonen kunne mærke en fartreduktion svarede over halvdelen da også; ja, meget. 35% svarede, ja lidt. 12% (svarende til to testsejlere) svarede nej. Knap 90% kunne altså mærke en fartreduktion gennem sæsonen (se diagram). Af de bådejere, der har mærket en fartreduktion har hovedparten mærket det fra juni måned, to fra maj, mens to først har mærket fartreduktion fra august.

Visse har angivet fartreduktionen i knob. Hovedparten opgiver reduktionen til 1-1½ knob. Yderpunkterne er hhv. ½ og 4 knobs reduktion i forhold til den normale fart. Denne angivelse må i de fleste tilfælde formodes at være baseret på bådejernes skøn og subjektive fornemmelse for fart, og kan derfor være behæftet med en vis usikkerhed.

18.5.3 Anderledes end tidligere anvendte malinger?

Bådejerne har også svaret på, hvorvidt forsøgsmalingerne har været anderledes at sejle med i forhold til tidligere anvendte bundmalinger.

71% af bådejerne mener, at forsøgsmalingerne virker anderledes end tidligere anvendte malinger. De resterende 19% (svarende til 4 både) mener ikke testmalingerne er anderledes at sejle med. Heraf er 3 ud af 4 motorjoller eller

speedbåde. Dette bekræfter, at sejlbåde er mere følsomme overfor begroning end motorbåde.

18.5.4 Hård kontra blød maling

Udfra bådejernes kommentarer er der tendens til, at der var mere begroning på og større fartreduktion i både, der sejlede med den hårde maling 2047 i forhold til både med 2022. Alle både malet med 2047 (på nær en der blev solgt i juni), svarede således, ja meget til spørgsmålene om begroning i vandlinien, og fartreduktion.

18.5.5 Testsejlernes kommentarer

De der svarede ja på spørgsmålet, om hvorvidt malingen var anderledes at sejle med end tidligere anvendte malinger, blev bedt om at beskrive hvordan. Ikke alle gjorde dette, men i bilag E er indkomne kommentarer samlet.

I resultatskemaet havde testsejlerne også mulighed for at give andre kommentarer til hvordan det havde været at sejle med testmalingerne. Disse kommentarer er også gengivet i bilag E.

Kommentarerne giver en indikation af, hvor effektive malingerne er, sammenlignet med deltagernes præferencer.

Af kommentarerne fremgår det tydeligt, at malingerne har givet anledning til reduktion af farten samt mere begroning i vandlinien end normalt. Derudover oplever flere at manøvreringsegenskaberne er forringede.

19 Konklusion på praktisk afprøvning

På baggrund af inspektionerne og bådejernes vurdering er følgende udsagn formuleret om de to enzymbaserede testbundmalinger:

- Begror tidligt med særdeles meget slim og alger. Testsejlerne observerede ret tidligt på sæsonen (juni) mere begroning i vandlinien end normalt.
- Farten er reduceret i forhold normalt og manøvreegenskaberne er forringede. Testsejlerne er samlet set utilfredse med sejladsegenskaberne.
- Fire sejlere valgte helt at udgå af forsøget på grund af generende begroning. Dette skete i hhv. juni og august. Det skal nævnes, at alle var kapsejlere.
- Den selvpolerende maling 2022 smitter meget af, men har trods dette tydeligt bedre antibegroningsegenskaber end den hårde maling 2047.
- Rurer forekommer kun i begrænset mængde på testmalingerne. Dette gælder dog ikke i Horsens, hvor testbådene allerede ved 1. inspektion var dækket af rurer (50-100%). Det gælder heller ikke på de både hvor testmalingen var poleret helt væk.
- Afrensning af begroning har været foretaget på hovedparten af testbådene. Ved afrensning er en del maling vasket af, da malingerne, som nævnt, let smitter af. Dette har sandsynligvis formindsket mængden af tilbagesiddende aktivstof og dermed reduceret antibegroningsegenskaberne.
- På helt uberørte både er hovedparten af malingen (særligt 2022) dog også forsvundet/poleret af som følge af almindelig sejlads. Dette gælder også på testbåde, der er påført to lag bundmaling. Poleringsegenskaberne er derfor ikke gode nok.

Det må konkluderes, at testmalingerne i deres nuværende formuleringer ikke kan leve op til sejlerens behov for en rimelig begroningsfri bund, der kan sikre manøvreringsevnen.

20 Perspektiver

Formålet med nærværende projekt har været at undersøge om der kunne udvikles et alternativ til de eksisterende bundmalinger til lystbåde som ikke indeholder biocider – men derimod baseret på enzymer og som derfor ikke ville have skadelige effekter på havmiljøet.

Det har ikke indenfor projekt perioden været muligt at udvikle et alternativ til de kommercielle biocid baserede produkter. Resultaterne fra undersøgelserne peger dog på at det er muligt at udvikle en enzymbaseret bundmaling som ikke har skadelige effekter på havmiljøet.

Undersøgelserne viser at der kan fremstilles – hårde - og selvpolerende malinger som ikke indeholder biocider men udelukkende er baseret på enzymer som den antibegroende komponent.

Sejlerne der har deltaget i undersøgelsen peger på at den selvpolerende maling polerer for hurtigt. I løbet af en sejsæson er malingen poleret væk og skibets bund er derfor uden antibegroende maling sidst på sejsæsonen.

Malingernes tekniske egenskaber kan forbedres så der opnås bedre påførings egenskaber og bedre dækkeevne. Det er også muligt at justerer hastigheden hvormed en malingen polerer.

Fra undersøgelserne fremgår det at i de eksisterende prototyper udvaskes enzymerne for hurtigt set i forhold til en sejsæson. Der kunne i laboratoriet måles enzym aktivitet fra udludnings bufferen der viste at malingsoverflade ville være "tømt" for enzym efter ca. 3 måneder. Det er derfor rimeligt at antage at overfladen i de påførte malinger mangler enzym som derfor giver anledning til de begroinger og fartreduktioner som sejlerne konstaterer.

For at forhindre en for hurtig udludning må enzymerne derfor forankres i malingen. Dette kan gøres ved at immobiliserer enzymerne til binder eller fyldstofferne i malingen eller ved at ændre på enzymernes overfladestruktur så ladningsegenskaberne ændres. Immobilisering og funktionalisering af enzymer er kendte teknologier.

Det er vigtigt at pege på resultaterne fra de øko-toksikologiske undersøgelser. Disse resultater viser at enzymerne nedbrydes 100% i løbet af 12 dage i havvand og der kunne ikke konstateres akutte toksiske effekter på alger, dafnier og fisk. Konklusionen er derfor at: på baggrund af de opnåede resultater vil AMG 300 L, Alcalase 2,5 L, Type DX og Pulpzyme® HC ikke skulle klassificeres som miljøfarlige i henhold til Kommissionens Direktiv 67/548/EEC om klassificering af farlige stoffer.

Disse resultater giver derfor et lovende perspektiv for det videre arbejde med udvikling af et miljøvenligt biocidfrit alternativ.

Dansk Sejlunion anser den enzymbasere malingsteknologi for et lovende biocidfrit alternativ. Testens resultater viser, at teknologien bør forbedres dels

for at øge antibegroningsegenskaberne især over for slim, alger og bryzoer dels for at opnå en lavere poleringshastighed af den selvpolerende maling.

Pladeforsøg udført af BioLocus har sideløbende med bådtesten vist, at enzymerne, i andre blandinger end de afprøvede i højere grad kan forhindre begroning.

Dansk Sejlunion håber derfor, at der til gavn for miljøet og lystsejlerne vil blive arbejdet videre på at forbedre teknologien.

21 Referencer

21.1 Sektion 1

Referencer i denne sektion 1 omfatter øvrige referencer end de der henvises til i kapitlerne 5 - 7 "økotoksikologiske undersøgelser". Disse referencer kan findes i sektion 2.

Bekendtgørelse nr 992, 5. december 2002.

Bonaventura, C., et al: US Patent 5,998,200: Anti-fouling methods using enzyme coatings, Dec. 7,1999. OPA, Singapore 2000.

Brandy F., R., Singer L., I.: Mechanical factors favoring release from fouling release coating, I: Biofouling, 2000, Vol. 15 (1-3), pp 73-81, OPA, Singapore 2000.

Directive of the European Parliament and of the Council (EC) No 98/98 of 16 February 1998

EU-parlamentets og Rådets direktiv 98/8/EF af 16. Feb. 1998 om markedsføring af biocidholdige produkter.

Foverskov, S.: Bundmaling til skibe-et miljøproblem. Tema-rapport30/1999, DMU, 1999.

Hansen, W. et. al.: Rapport nr. 50. Trykfarvepigmenters lysægtighed. August 1964. Lak og Farveindustriens Forskningslaboratorium.

Holmstrom, C. et.al.: Bacteria immobilised in gels: methodologies for antifouling and biocontrol applications. – Biofouling, 200, vol. 15 (1-3), pp 109-117. OPA, Singapore 2000.

HUT bestemmelse: Food Chemicals CODEX, 3rd ed., (1981), pp. 496-497, National Academy Press, Washington, D.C.

Keystones Inc.: Anti-fouling Paint Desk Market Research Report, august 2001.

Kragh, K., M., og Poulsen, H., Ch.: Composition, Patentnr.: WO0075293, Danisco, 2000.

Madsen, T., et al: Kortlægning og vurdering af antibegroningsmidler til lystbåde i Danmark. Miljøprojekt nr.384. Miljø- og Energiministeriet, Miljøstyrelsen, 1998.

Madsen, T, et al: Økologisk vurdering af begroningshindrede biocider og biocidfrie bundmalinger. Miljøprojekt nr.507. Miljøstyrelsen, 1999.

- Madsen, T., et al: Gode alternativer til giftig maling, Miljøstyrelsen, 2000
http://www.mst.dk/udgiv/artikler/2000/00_074.htm
- Mathewson, R., P.: "Enzymes" Eagan Press Handbook Series, 1998
- MER 1997: Anti-fouling: IMO considering 10 year TBT phase-out proposal. In: Marine Engineers Review, p. 25, 1997.
- MER 1997: Anti-fouling: The future of antifouling: will it be non-stick or natural biocides? In: Marine Engineers Review, pp 25-26, 1997.
- MER 1997: Anti-fouling: Barnacle larvae in for a shock with AC antifouling system. In: Marine Engineers Review, pp 26-28 1997.
- NERI: Report and activities 1999-2000. Redig. af Pedersen, C.J., Ministry of Environment and Energy. National Environmental Research Institute, Denmark, April 2000.
- Nielsen, G., et al.: Undersøgelse af kritisk frigivelseshastighed for kobber fra bundmaling til lystbåde. Miljøprojekt nr. 611/2001. Miljøstyrelsen, 2001. (Udkommer kun elektronisk: www.mst.dk)
- Rittschof, D.: Natural product antifoulants: one perspective on the challenges related to coatings development. – Biofouling, 2000, vol 15 (1-3), pp119-127. OPA, Singapore 2000.
- Schneider, I., Allermann, K.: Antifouling paint composition comprising rosin and enzyme, BioLocus, PCT/DK01/00202, WO 01/72911, 2001.
- TNO-report, Antifouling Activity of Enzymes, No. CA.04/1047, 1994
- Turley A., P., et al: Pyrithiones as antifoulants: Environmental chemistry and preliminary risk assessment, I: Biofouling, Vol. 15(1-3), pp 175-182, OPA, Singapore 2000.
- Truby, K. et al.: Evaluation of the performance enhancement of silicone biofouling-release coatings by oil incorporation. I: Biofouling, 2000, vol 15 (1-3) pp. 141-150. OPA, Singapore 2000.
- Watermann, B., et al: Performance of biocide-free antifouling paints. Trials on deep-sea going vessels. Summary of Volume I. Application of test paints and inspections of 2000. Multi-stakeholder project of WWF Germany with ministries and paint manufacturers. WWF Deutschland, Frankfurt am Main, 2001.
- Watts, James L., US Patent & Trademark Office : Anti-fouling coating composition containing capsaicin. Patent Full Text and Image Database, Patentnr.: 5,397,385. 1995.
http://164.195.100.11/netacgi/nph_Parser?Sect1=PTO&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=01-10-2001
- White, A, Handler, P and Smith, E.L., Principles of Biochemistry, ISBN 0-07-069758-2, 5. Edition 5, 1973

Willemsen P.R. Antifoulants from marine invertebrates - Sponges. In: Proceedings Workshop "Biofouling: problems and solutions" University of New South Wales, Sydney, Australia, 13-14 April 1994.

WWF Verdensnaturfonden: Giftig skibsmaling truer verdens have, oktober 2001

<http://panda.dk/show.phtm/?id=138>

www.biolocus.com

www.bioweb.dk

www.cleanseasco.com

www.danisco.com

www.dmu.dk

www.genencor.com

www.mst.dk

www.novozymes.com

21.2 Sektion 2

Denne sektion 2 omfatter referencerne til de økotoxikologiske undersøgelser kapitlerne 5 - 7.

- /1/ OECD Guideline for Testing of Chemicals (1992): 306 Biodegradability in Seawater. OECD, Paris, 1992 Adopted 17. July 1992.
- /2/ OECD Guideline for Testing of Chemicals: "Algae, Growth Inhibition Test". No. 201, 1984.06.07.
- /3/ ISO International Standard 10253, 1995. "Water Quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylen tricorutum*".
- /4/ OECD Guideline for testing of chemicals No. 202: " *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test". 1984.04.04.
- /5/ ISO International Standard 6341: "Water Quality - Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)" 1996.04.01 and Technical Corrigendum 1, 1998.06.15.
- /6/ OECD Guideline for testing of chemicals: "Fish Acute Toxicity Test". No. 203, 1992.07.17.
- /7/ ISO 7346-2 Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 2: Semi-static method. 1996.06.15.

- /8/ VKI, 1999. TOXEDO Ver. 1.5. Program for statistical estimation of EC values, based on experimental data from ecotoxicological assays.
- /9/ US-EPA, 1994. Dunnett Program Version 1.5. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory (EMSL). US Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- /10/ Probit analysis. Version 2.3, 1992.01.22. Statens Naturvårdsverk (National Swedish Environmental Protection Board. The data section).
- /11/ Danish Standards Association (1997): DS/EN 1484 Water analysis - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
- /12/ GLP Study Report (2002). Biodegradability in Seawater- Manometric respirometry test with AMG 300 L. GLP Study No. 91317/942. DHI Water & Environment.
- /13/ GLP Study Report (2002). Biodegradability in Seawater- Manometric respirometry test with Alcalase 2,5 L, Type DX. GLP Study No. 91317/943. DHI Water & Environment.
- /14/ GLP Study Report (2002). Biodegradability in Seawater- Manometric respirometry test with Pulpzyme® HC. GLP Study No. 91317/944. DHI Water & Environment.
- /15/ GLP Study Report (2002). Algal growth inhibition test with AMG 300 L. GLP Study No. 91331/942. DHI Water & Environment.
- /16/ GLP Study Report (2002). Algal growth inhibition test with Alcalase 2,5 L, Type DX. GLP Study No. 91331/943. DHI Water & Environment.
- /17/ GLP Study Report (2002). Algal growth inhibition test with Pulpzyme® HC. GLP Study No. 91331/944. DHI Water & Environment.
- /18/ GLP Study Report (2002). Algal growth inhibition test with [AMG+Alcalase+Pulpzyme]. GLP Study No. 91331/942/943/944. DHI Water & Environment.
- /19/ GLP Study Report (2002). Immobilization test of AMG 300 L with *Daphnia magna*. GLP Study No. 91319/942. DHI Water & Environment.
- /20/ GLP Study Report (2002). Immobilization test of Alcalase 2,5 L, Type DX with *Daphnia magna*. GLP Study No. 91319/943. DHI Water & Environment.
- /21/ GLP Study Report (2002). Immobilization test of Pulpzyme® HC with *Daphnia magna*. GLP Study No. 91319/944. DHI Water & Environment.

- /22/ GLP Study Report (2002). Immobilization test of [AMG+Alcalase+Pulpzyme] with *Daphnia magna*. GLP Study No. 91319/942/943/944. DHI Water & Environment.
- /23/ GLP Study Report (2002). Zebra fish (*Danio rerio*) acute toxicity test with AMG 300 L. GLP Study No. 91335/942. DHI Water & Environment.
- /24/ GLP Study Report (2002). Zebra fish (*Danio rerio*) acute toxicity test with Alcalase 2,5 L, Type DX. GLP Study No. 91335/943. DHI Water & Environment.
- /25/ GLP Study Report (2002). Zebra fish (*Danio rerio*) acute toxicity test with Pulpzyme® HC. GLP Study No. 91335/944. DHI Water & Environment.
- /26/ GLP Study Report (2002). Zebra fish (*Danio rerio*) acute toxicity test with [AMG+Alcalase+Pulpzyme]. GLP Study No. 91335/942/943/944. DHI Water & Environment.
- /27/ EU Kommissionen (1967): Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer.

Undersøgelse af enzymeres evne til at nedbryde cypriders klæbestoffer

Undersøgelserne der er udført hos TNO kan sammenfattes som følger:

Eksperiment 1

Tre forskellige protease præparater blev testet i koncentrations-området 10 – 1000 µg enzym/ml. De testede præparater var Alcalase, SP-234 og SP-249 alle leveret af Novozymes A/S (Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Denmark). SP 234 og SP 249 er eksperimentelle præparater med et højt indhold af proteolytisk aktivitet samt andre ikke proteolytiske enzymaktiviteter. Alcalase er en kommerciel protease som blandt andet anvendes i vaskepulver.

Testen blev udført i fire dobbelt bestemmelser i polystyren "multi well (2x3)" plader fra Steriline Ltd. Mellem 25 – 40 cyprider blev tilsat (med en Pasteur pipette) til brøndene som indeholdt 2 ml filtreret havvand (kontrol) eller enzymopløsning. Test opløsningerne blev fremstillet ved direkte at opløse enzymerne i sterilfiltreret "naturligt" havvand. Pladerne blev inkuberet 24 timer ved en temperatur på 27 +/- 1 ° C og med en 15:9 lys-mørke cyklus . Efter inkubation blev cypriderne screenet for tegn på toksiske effekter ved anvendelse af mikroskop. Testen blev afsluttet ved tilsætning af en dråbe 40% formaldehyd og antallet af permanente og ikke fasthæftede larver blev talt.

Dose (µg/ml)	10	50	100	500	1000
Kontrol	80%	80%	80%	80%	80%
Alcalase	50%	0%	0%	0%	0%
SP 234	85%	88%	75%	10%	0%
SP 249	50%	70%	40%	20%	20%

Tabel A1 viser resultaterne og det fremgår heraf at det kommercielle enzym Alcalase er i stand til at hindre 100% fasthæftning ved en koncentration på 50 - 1000 µg/ml.

De to SP præparater var ikke så effektive som Alcalasen.

Eksperiment 2

For yderligere at undersøge enzymernes effektivitet blev et forsøg med sammenligning af protease aktiviteterne sat op. Enzympræparaterne indeholdt proteaser målt ved hjælp af HUT - aktivitet. (HUT: Haemoglobin Units on Tyrosine basis). HUT aktiviteten af proteaserne kan bestemmes som beskrevet i f.eks. (Food Chemicals, 1981).

Enzym præparaterne indeholdt følgende protease aktivitet:

Alcalase: ca. 1,300,000 HUT/g

SP 234: ca. 500,000 HUT/g

SP 249: ca. 600 HUT/g

Alle enzymerne blev testet ved koncentrationer svarende til 6000 HUT/l og 60000 HUT/l og fasthæftningens assayet blev anvendt som beskrevet ovenfor.

Tabel A2				
Treatment	HUT/l	ppm (µg/ml)	% Cyprid settlement	G-test (ns= not significant)
Control	0	0	63	-
Alcalase	6,000 60,00 0	4.6 46	34 0.8	19.37; p<0.005 124.1; p<<0.005
SP 234	6,000 60,00 0	12 120	62 52	0.005; ns 2.665; ns
SP 249	6,000 60,00 0	1,000 10,000	52 0	2.702; ns 134.6; p<<0.005

Det ses tydeligt af tabel A2, at Alcalase signifikant forhindrer fasthæftelse ved 6000 HUT/l (4.6 ppm), og fuldstændigt forhindrer fasthæftelse ved 60,000 HUT/l (46 ppm).

SP234 har ingen signifikant indvirkning på fasthæftningen både ved 6.000 HUT/l and 60,000 HUT/l. SP 249 forhindrer fuldstændigt fasthæftningen ved 60,000 HUT/l mens der ikke er nogen signifikant indvirkning ved 6,000 HUT/l.

I alle opløsningerne – undtaget SP249 ved 6000 HUT/l – så cypriderne "raske" ud efter 24 timers inkubation hvilket indikerer en non-toksisk karakter af opløsningerne. I SP249 var larverne stadig i live i 6000 HUT/l opløsningen, men de udviste ikke normal svømmebevægelse og fasthæftnings adfærd.

For en nærmere beskrivelse af resultaterne se (TNO-report, 1994)

Forsøg med enzym og bindemidler og indledende feltforsøg

1.1 Forsøg med enzym og bindemidler

Baseret på ovenstående eksperimenter blev Alcalase valgt som kandidat for yderligere undersøgelser. For at teste Alcalase enzym aktiviteten i forskellige og typiske binder komponenter der indgår i malinger blev følgende forsøg udført.

Alcalasen blev testet for kompatibilitet med 7 forskellige bindere som sædvanligvis anvendes i marine malinger ved at teste rest enzym aktiviteten efter 24 timer inkubation ved 36 ° C.

De 7 forskellige bindere var: modificeret harpiks, hydrogeneret harpiks, polyvinyl acetate emulsion, polyvinyl methyl ether, polyvinyl klorid copolymer, acrylic harpiks copolymer og silicone binder.

Alcalase blev tilsat og blandet med de ovenfor nævnte bindere ved 4 forskellige enzym koncentrationer (0.25%, 0.50%, 1.0%, and 2%, vægtprocent). De tilsatte mængder enzym blev baseret på tørvægts indholdet i binderne.

Små dråber af de forskellige bindere indeholdende Alcalase blev fremstillet og påført parafilm. Vægten af de tørrede dråber var ca. 0.1 – 0.15 g pr. dråbe. De tørrede dråber af enzym/binder blanding med forskellige mængder enzym blev sammen med en kontrol inkuberet på en skummet mælk agar plade ved 36 ° C i 20 dage.

Tabel B1. Enzym aktivitet (klar zone, visuel vurdering)				
Enzyme mængde (se note)	A	b	c	d.
Modified rosin, dry matter 55%	+	+	+	+
Hydrogenated rosin, dry matter 50%	+	+	+	+
Polyvinyl acetate emulsion, dry matter 55%	-	-	+	+
Polyvinyl methyl ether, dry matter 35%	-	-	-	-
Polyvinyl chloride copolymer, dry matter 40%	-	-	-	-
Acrylic resin, copolymer, dry matter 40%	-	-	-	-
Silicone binder, dry matter 63%	-	-	-	-

Note: a = 0,25%, b = 0.5%, c = 1.0%, d = 2.0% , + = enzymaktivitet detekteret, - = enzymaktivitet ikke detekteret.

Det fremgår af tabel B1 at Alcalase aktiviteten er påvirket af bindertypen. Det ses at enzymaktiviteten var tilstede, når denne var sammenblandet med modificeret og hydrogeneret harpiks (rosin).

Det ses også, at der ikke kunne konstateres enzymaktivitet ved acryl, silicone samt nogle af polyvinyl bindere.

Det er dog ikke ensbetydende med at enzymer ikke vil kunne virke sammen med disse bindere. Det har blot under de givne forsøgsbetingelser ikke været muligt at detektere enzym aktivitet, sandsynligvis fordi disse bindere giver en meget lukket overfladestruktur.

1.2 Indledende feltforsøg

Feltforsøg blev udført i havvand for at undersøge effektiviteten af sammensætningen af forsøgsmalinger indeholdende Alcalase i kombination med to andre kommercielle enzymprodukter en amyloglucosidase og et xylanase produkt.

To forsøgsmalings produkter indeholdende enzymer blev fremstillet. Malingerne blev benævnt BioB and BioS afhængig af om den var solvent baseret (BioB) eller vand baseret (BioS).

Den solvent baserede forsøgsmaling (BioB) indeholdt følgende komponenter; Naturlig harpiks, acryl binder, dispergerings midler, titandioxid, fyldstof samt aromatiske kulbrinter.

Den vand baserede maling (BioS) indeholdt følgende komponenter; Polyvinylacetate, hjælpe stoffer, titandioxid, fyldstoffer, naturlig harpiks samt vand.

Følgende enzymer blev anvendt : Alcalase, amyloglucosidase (AMG) og Pulpzyme, alle leveret af Novozymes A/S, Denmark.

Enzymerne blev tilsat de to forskellige marine forsøgs malinger i koncentrationer som angivet i tabel B2.

Paint	Enzyme (% weight)	Total enzyme conc. (% weight)
A 0.5	Alcalase (0.5%)	0.5
A 2.0	Alcalase (2.0%)	2.0
B 0.5	AMG (0.5%)	0.5
B 2.0	AMG (2.0%)	2.0
C 0.5	Pulpzyme (0.5%)	0.5
C 2.0	Pulpzyme (2.0%)	2.0
D 2.0	Alcalase (1%) + AMG (1%)	2.0
E 2.0	Alcalase (1%) + Pulpzyme (1%)	2.0
F 2.0	Alcalase (2/3%) + AMG (2/3%) + Pulpzyme (2/3%)	2.0

Sandblæste akryl plader (10 x 20 x 0.5 cm) blev malet med en af de to marine malinger med et areal på ca. 130 cm² og en tykkelse på henholdsvis 100 micron for BioB og 85 micron for BioS.

Efter tørring blev panelerne monteret på en ramme med 5 x 3 paneler pr. ramme. Rammerne blev nedsænket i havvand i to forskellige havne i Danmark (Jyllinge havn med stillestående vand og Helsingør lystbådehavn med høj vandudskiftning) i 6 måneder (5. maj 2000 til 13. november 2000). Panelerne blev inspiceret månedligt. Rammerne blev placeret på en sådan måde at den øvre del af rammen var ca. 1 meter under havoverfladen.

I slutningen af perioden blev rammerne hjemtaget til laboratoriet og evalueret for antal rurer der var fasthæftet. Floraen på panelerne blev også evalueret. Overfladen på panelerne blev også evalueret for strukturelle ændringer dvs. om der var revner og huller i forsøgsmalingen.

Resultaterne kan ses i tabel B3.

Tabel B3 Evaluering af begroning på paneler med forsøgsmalinger		
Panel number	Explanation to panel number	Number of barnacles
Blank	Panel without paint	66
0-0	BioB without enzymes	17
D 2.0	BioB + Alcalase + AMG	4
E 2.0	BioB + Alcalase + Pulpzyme	9
F 2.0	BioB + Alcalase + AMG + Pulpzyme	7
W-0-0	BioS without enzymes	38
W-D 2.0	BioS + Alcalase + AMG	30
W-E 2.0	BioS + Alcalase + Pulpzyme	45
W-F 2.0	BioS + Alcalase + AMG + Pulpzyme	44
Ref. 1	Bravo, Hempel A/S	0
Ref. 2	Seatech, Hempel A/S	0

Kun paneler fra Helsingør havn er vist i tabel 4B. Da der ved forsøgets afslutning ikke kunne konstateres vækst af rurer på panelerne i Jyllinge havn (kontrol og prøver), er disse resultater ikke vist.

Det ses klart fra tabel B3 at panelerne BioB indeholdende enzym kun var begroet med få rurer sammenlignet med BioB paneler uden enzym. Det kan altså konkluderes at kombinationen af BioB med enzymerne Alcalase og AMG signifikant reducerede fasthæftningen af rurer (sammenlignet med BioB som ikke indeholdt enzym. De to reference prøver (Ref. 1 og 2 i Tabel 4 B) leveret af Hempel indeholdt begge biociderne Irgarol og Diuron, biocider der i dag er forbudte til anvendelse i marine malinger i Danmark.

Udvalgte paneler fra BioB og BioS blev undersøgt med lup (4 x) for anden animalsk fouling end rurer. Der var ikke observeret andre animalske organismer end rurer på disse paneler.

Med hensyn til floraen på panelerne havde BioB panelerne med enzym kun få typer af alger fasthæftet med kiselalgen *Schizonema* som den dominerende, mens kontrolpladerne var fuldstændig overgroet med forskellige typer af alger. Alge foulingen på BioB pladerne med enzym var lette at rengøre idet begroingen let kunne fjernes med en fugtig svamp. Det kan derfor konkluderes at brugen af Alcalase i kombination med AMG/Pulpzyme signifikant reducerer mængden af algebegroing.

BioB og BioS panelerne blev inspiceret for huller og revner med en lup (4x).

Overfladerne af paneler malet med BioB var stadig fuldt intakte efter 6 måneder i havvand. Derimod viste BioS panelerne nogle revner og huller hvor der kunne detekteres begroning.

Måling af enzymaktivitet i udvaskningsbuffer

Der er udført målinger på udvasket enzym i udvaskningsbuffer for fire malingsystemer. Udvasningsbufferen er skiftet daglig og der er målt enzymaktivitet på prøverne. Tabel 1 viser variationen mellem de fremstillede malingsfilm. Dette gælder også tilsat mængde protease/Alcalase opløsning i malingsfilmen. Tørstoffet/enzymindholdet for denne opløsning er ikke kendt. Den tilsatte enzymopløsnings enzymaktivitet er beregnet og angivet i mAu. Malingsfilmene har henstået 11 dage hvorefter udvaskningen i buffer er

Tabel C1 Påførte mængder maling på pipetter og målt absorbans påbegyndt. Forsøget blev stoppet efter 3 døgn, da de målte absorbanser (E) var meget små.

Prøve	Mængde maling (g)	Alcalase opløsning (mg)	mAU tilsat malingsfilmen	E 1. døgn	E 2. døgn	E 3. døgn
118	0,2034	6,22	15,56	0,67	0,51	
118	0,2917	8,93	22,32	0,69	0,46	0,14
118	0,2396	7,33	18,33	0,73	0,47	0,18
119	0,1666	4,91	12,29	0,65	0,37	0,20
119	0,1697	5,01	12,52	0,72	0,37	0,24
120	0,1771	5,42	13,55	0,73	0,62	0,16
120	0,1382	4,23	10,57	0,63	0,48	0,20
120	0,1302	3,98	9,96	0,66	0,48	0,17
F-5	0,5631	15,88	39,70	0,52	0,64	0,23
F-5	0,4824	13,60	34,01	0,53	0,61	0,17

Ved hjælp af referencekurven beregnes enzymaktiviteten i udvaskningsbufferen på baggrund af absorbansen. Herefter er mængden af udvasket enzym (Alcalase) i mg opløsning og reduktionen af Alcalase i malingsfilmen beregnet. Ligeledes kan resultatet udtrykkes i enzymaktivitet (mAu) der stadig er tilbage i malingsfilmen. De beregnede resultater findes i tabel C2 og tabel C3.

Tabel C2 Beregnede resultater for enzymaktivitet og udvasket mængde enzym.

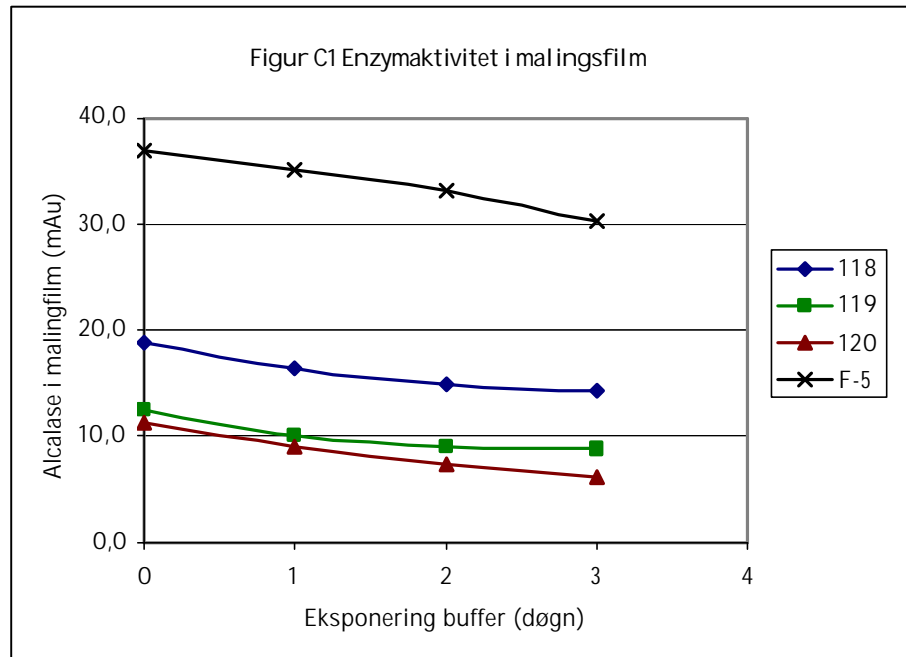
Prøver	Enzymaktivitet (mAU/ml)			Udvasket mængde Alcalase opløsning (mg)		
	Døgn 1	Døgn 2	Døgn 3	Døgn 1	Døgn 2	Døgn 3
118	0,57	0,40		0,91	0,63	
118	0,59	0,34		0,95	0,54	
118	0,64	0,35	0,03	1,03	0,56	0,05
Gns	0,60	0,36	0,03	0,97	0,58	0,02
119	0,55	0,24	0,05	0,89	0,39	0,08
119	0,62	0,24	0,10	0,94	0,39	0,12
Gns	0,59	0,24	0,07	1,02	0,83	0,01
120	0,64	0,52	0,01	0,85	0,58	0,08
120	0,53	0,36	0,05	0,89	0,58	0,03
120	0,56	0,36	0,02	0,92	0,66	0,04
Gns	0,57	0,41	0,03	0,65	0,86	0,14
F-5	0,41	0,54	0,09	0,94	0,39	0,12
F-5	0,42	0,51	0,02	0,67	0,81	0,03
Gns	0,41	0,52	0,05	0,66	0,84	0,08

Tabel C3 Beregnede resultater for reduktion af enzymaktivitet og mængde enzym i malingsfilmen.

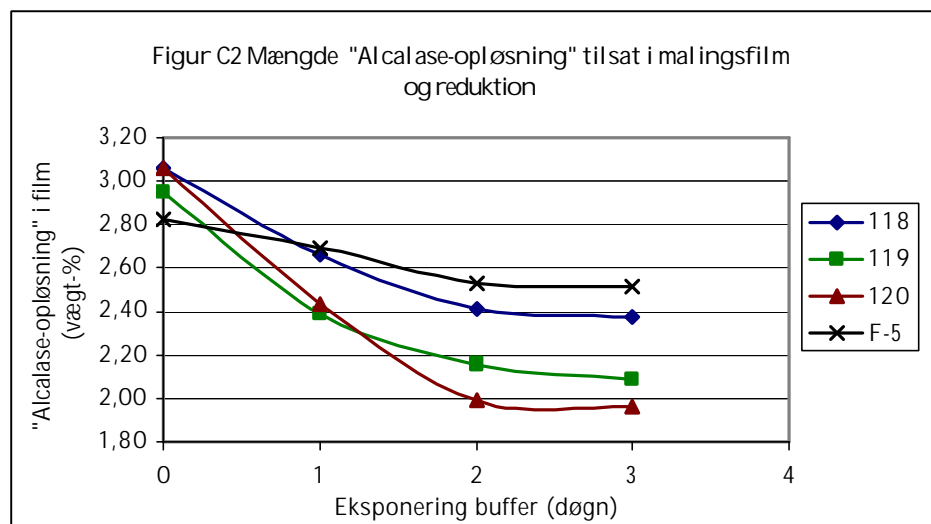
Prøver	Reduktion i Enzymaktivitet (mAU)				Mængde "Alcalase opløsning" tilsat og forbrugt fra malingsfilm (vægt-%)			
	Døgn 0	Døgn 1	Døgn 2	Døgn 3	Døgn 0	Døgn 1	Døgn 2	Døgn 3
118	15,56	13,27	11,69		3,06	2,61	2,30	
118	22,32	19,94	18,57		3,06	2,73	2,55	
118	18,33	15,75	14,34	14,23	3,06	2,63	2,39	2,37
Gns	18,7	16,3	14,9	14,23	3,06	2,66	2,41	2,37
119	12,29	10,07	9,11	8,90	2,95	2,42	2,19	2,14
119	12,52	10,02	9,05	8,67	2,95	2,36	2,13	2,04
Gns	12,4	10,0	9,1	8,78	2,95	2,39	2,16	2,09
120	13,55	11,00	8,93	8,90	3,06	2,48	2,02	2,01
120	10,57	8,46	7,01	6,80	3,06	2,45	2,03	1,97
120	9,96	7,73	6,28	6,20	3,06	2,37	1,93	1,91
Gns	11,4	9,1	7,4	6,20	3,06	2,44	1,99	1,96
F-5	39,70	38,06	35,90	35,56	2,82	2,70	2,55	2,53
F-5	34,01	32,35	30,32	30,24	2,82	2,68	2,51	2,51
Gns	36,9	35,2	33,1	30,24	2,82	2,69	2,53	2,52

Ved udførelsen af analysen var der en del variation mellem den mængde maling der påføres den enkelte pipette om end det i alle tilfælde foregår ved neddykning. Oprindeligt var der et ønske om at udføre "trippel-analyser". En enkelt prøve har ved påføringen ikke kunnet godkendes og endvidere er enzymanalysen mislykket i et par tilfælde. Dette har betydet at der kun er lavet dobbeltbestemmelse for to af malingerne. Når absorbansen bliver for lav kan enzymaktiviteten ikke beregnes, da resultatet ligger udenfor referencekurven. Dette viser sig blandt andet ved negative tal. Dette er markeret med grå felter i tabellerne. Der afgives mest enzym de første to dage. Usikkerheden ved målingen efter tredje døgn bliver stor, da udvaskningen på dette tidspunkt er meget lav.

Figur C1 viser at lagtykkelsen for den opløsningsmiddelbaserede maling F-5 er væsentlig højere end for de vandfortyndbare (118-120). Det vil sige større lagtykkelse betyder større mængde tilsat enzym og dermed enzymaktivitet.



Resultaterne viser endvidere at den opløsningsmiddelbaserede maling (F5) procentuelt afgiver mindre mængde Alcalase det første døgn end de vandfortyndbare produkter (118-120). Se figur C2. Endvidere kan det konkluderes at udludningen af enzym ser ud til at stagnere på en lav afgivelse efter de første par døgn..



1.1 Måling af protein i udvaskningsbuffer

Der er udført målinger af udvasket enzym i udvaskningsbuffer for fire malinger ved hjælp af proteinmåling. Malingerne er tilsat 5 %

enzymopløsning (protease, glucoamylase og xylanase). Udvaskningsbufferen er skiftet daglig og der er målt proteinindhold i prøverne. Det bør bemærkes at tørstoffet i enzymopløsningerne ikke er kendt. Tabel C4 viser variationen mellem de fremstillede malingsfilm og variationen i den samlede mængde enzymopløsning/protein. Prøverne var 11 dage inden udvaskningen i buffer blev påbegyndt. Forsøget blev afbrudt efter 3 døgn, da de målte absorbanser (E) var små.

Tabel C4. Påførte mængder maling på pipetter og målt absorbans (protein).						
118	0,2034	15,58	1,25	0,64	0,13	
Prøve.	Mængde maling (g)	Enzymopløsning. (mg)	Mængde protein (mg)	E 1. døgn	E 2. døgn	E 3. døgn
118	0,2917	22,34	1,80	0,73	0,14	0,03
118	0,2396	18,35	1,47	0,69	0,14	0,04
119	0,1666	12,26	0,99	0,55	0,08	0,02
119	0,1697	12,49	1,00	0,56	0,07	0,02
120	0,1771	13,57	1,09	0,67	0,14	0,04
120	0,1382	10,59	0,85	0,53	0,07	0,02
120	0,1302	9,97	0,80	0,47	0,08	0,01
F-5	0,5631	39,64	3,18	0,21	0,08	0,07
F-5	0,4887	34,40	2,76	0,12	0,12	0,01
F-5	0,4824	33,96	2,73	0,16	0,08	0,08

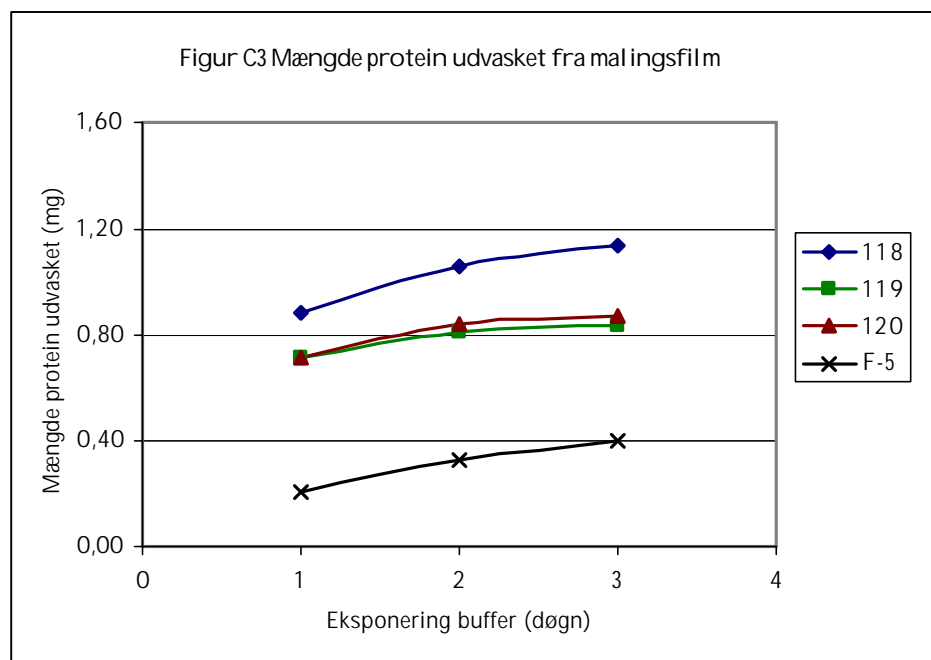
Ved hjælp af referencekurven beregnes proteinindholdet i bufferen på baggrund af absorbansen. Herefter beregnes mængde udvasket enzym/protein i alt i mg. De beregnede resultater findes i tabel C5.

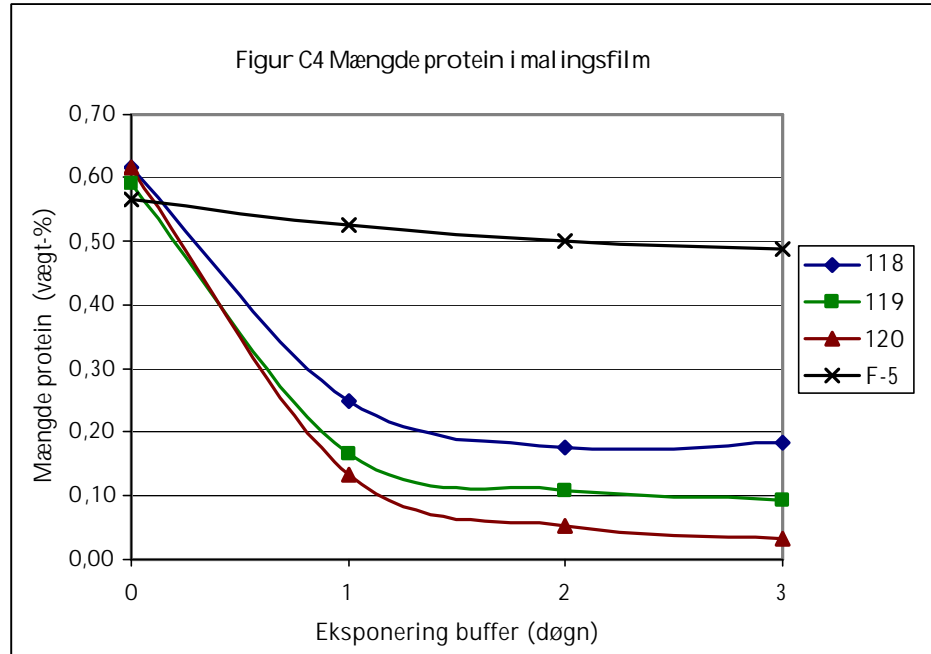
Tabel C5 Beregnede resultater for udvasket mængde protein og proteinindhold i malingsfilmen.							
Prøver	Udvasket mængde protein (mg)			Mængde protein i malingsfilm (vægt-%)			
Prøver.	Døgn1	Døgn 2	Døgn 3	Døgn 0	Døgn1	Døgn 2	Døgn 3
118	0,82	0,99		0,62	0,21	0,13	
118	0,94	1,12	1,16	0,62	0,29	0,23	0,22
118	0,89	1,07	1,12	0,62	0,24	0,17	0,15
Gns	0,88	1,06	1,14	0,62	0,25	0,18	0,18
119	0,71	0,81	0,84	0,59	0,17	0,10	0,09
119	0,72	0,81	0,84	0,59	0,17	0,11	0,10
Gns	0,71	0,81	0,84	0,59	0,17	0,11	0,09
120	0,86	1,04	1,09	0,62	0,13	0,03	0,00
120	0,68	0,77	0,80	0,62	0,12	0,06	0,04
120	0,61	0,71	0,72	0,62	0,15	0,07	0,06
Gns	0,72	0,84	0,87	0,62	0,13	0,05	0,03
F-5	0,27	0,37	0,46	0,57	0,52	0,50	0,48
F-5	0,15	0,31	0,32	0,57	0,53	0,50	0,50
F-5	0,21	0,31	0,41	0,57	0,52	0,50	0,48
Gns	0,21	0,33	0,40	0,57	0,52	0,50	0,49

Ved udførelsen af analysen har der været de samme problemer som ved måling af enzymaktivitet. Proteinindholdet kan beregnes selvom absorbansen er lav da referencekurven går igennem 0. En enkelt måling er fejlagtig, denne er markeret med gråt felt i tabellerne. Der afgives mest protein/enzym de første to dage. Usikkerheden ved målingen er også her meget stor efter tredje døgn, da udvaskningen på dette tidspunkt bliver lavere.

Resultatet viser at den opløsningsmiddelbaserede maling afgiver væsentlig mindre mængde enzym/protein end de vandfortyndbare produkter; se figur C3. Endvidere kan det konkluderes at udludningen af enzym ser ud til at stagnere på en lav afgivelse efter de første par døgn.

Når resultatet udtrykkes i vægt-% af malingsfilm (figur C4) ses at proteinindholdet i de vandfortyndbare reduceres kraftigt. Den opløsningsmiddelbaserede afgiver en væsentlig mindre mængde protein.





1.2 Evaluering af indledende forsøg

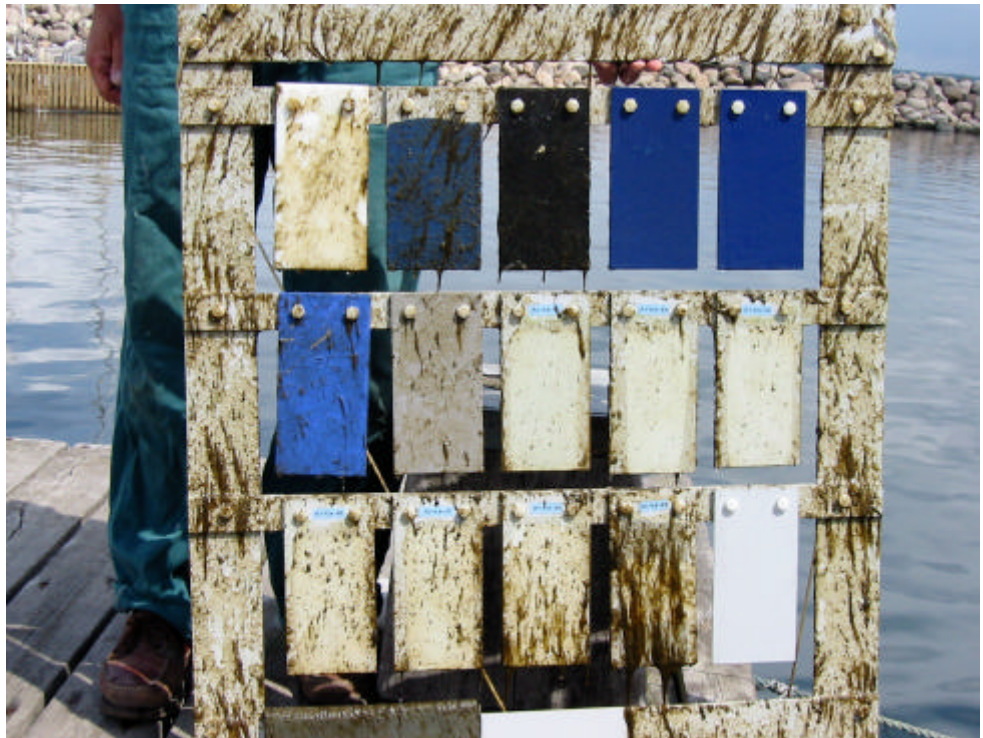
Resultaterne fra udvaskningsforsøgene viser en tydelig udludning ved måling af protein og nedgang i enzymaktivitet. Ved måling af protein fås summen af de tre udludede enzymer. Ved måling af enzymaktivitet fås kun udludning af Alcalase. Det kan også konstateres at udvaskningen af protein er væsentlig større end udvaskningen af Alcalase for de vandfortyndbare produkter. Dette kan tyde på at enzymerne udvaskes med forskellig hastighed. Dog kan det også skyldes måleusikkerheder. For at sikre resultaternes validitet er der udført en kontrolmåling på den opløsningsmiddelbaserede maling, men i fire forskellige formuleringer. Endvidere var der behov for at måle udludning over et længere tidsrum for at se om udludningshastigheden bliver konstant. Dette betyder at eksponeringstiden i buffer må ændres efterhånden som udludningshastigheden bliver lavere.

Raft test 2002

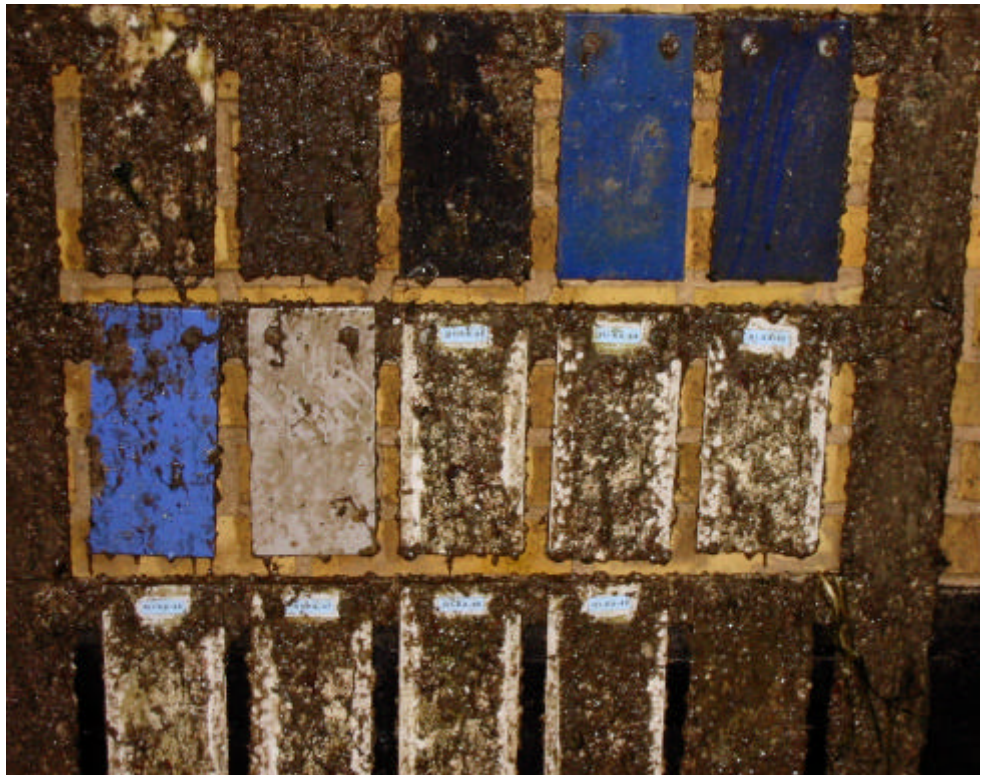
Panelerne er monteret i rafts med 15 paneler fordelt på 3 rækker med 5 paneler i hver række, se tabel D1. Et raft er ca 80x90 cm. **Paneler med blå tekst på fotos er projektets paneler**

Tabel D1. Oversigt over placering af paneler på raft	
Panel position	Panel mrk
Øverste række:	
1) øverst til venstre	Blank panel
2) plads 2 mod højre	TEST
3) plads 3 mod højre	TEST
4) plads 4 mod højre	Reference, "højt" CU indhold (kommercielt produkt)
5) plads 5 mod højre	Reference, lavt Cu indhold
Mellem række:	
6) plads 1 til venstre	Silicone 1
7) plads 2 mod højre	Silicone 2
8) plads 3 mod højre	F5.8 uden enzym
9) plads 4 mod højre	F5.8
10) plads 5 mod højre	F5.9
Nederste række:	
11) plads 1 til venstre	F5.10
12) plads 2 mod højre	F5.11 uden enzym
13) plads 3 mod højre	F5.11
14) plads 4 mod højre	F5.11 med primer
15) plads 5 mod højre	Lak, panel påsat raft 12.06.2002

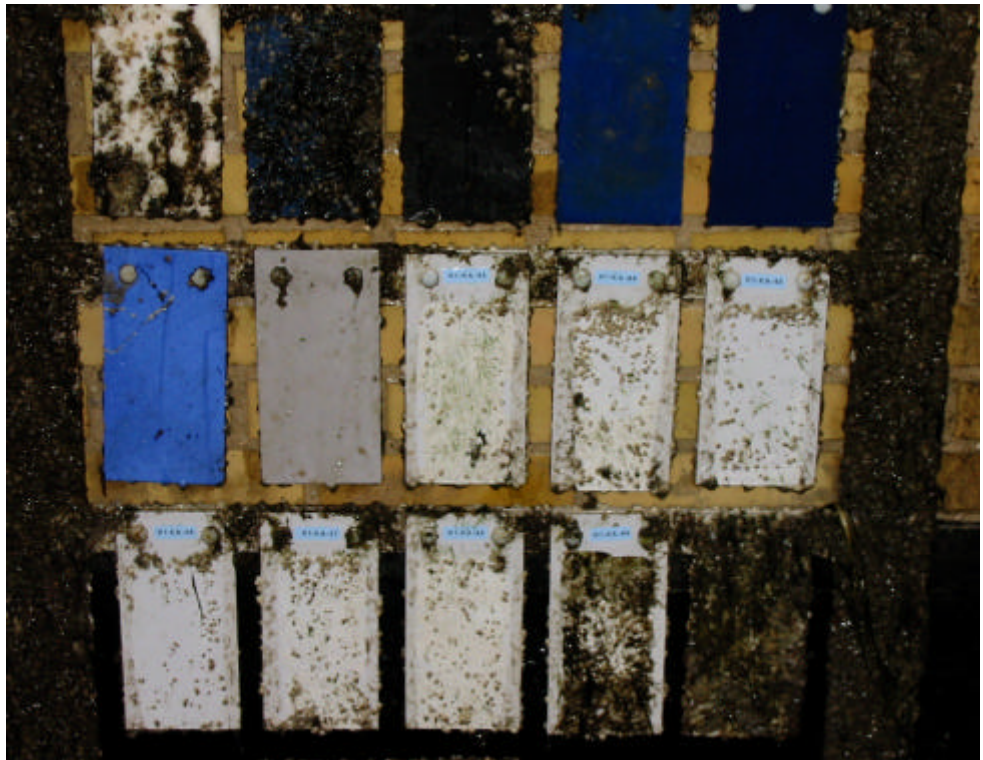
Billede D1 Helsingør 12-6-2002, ved 1. inspektion



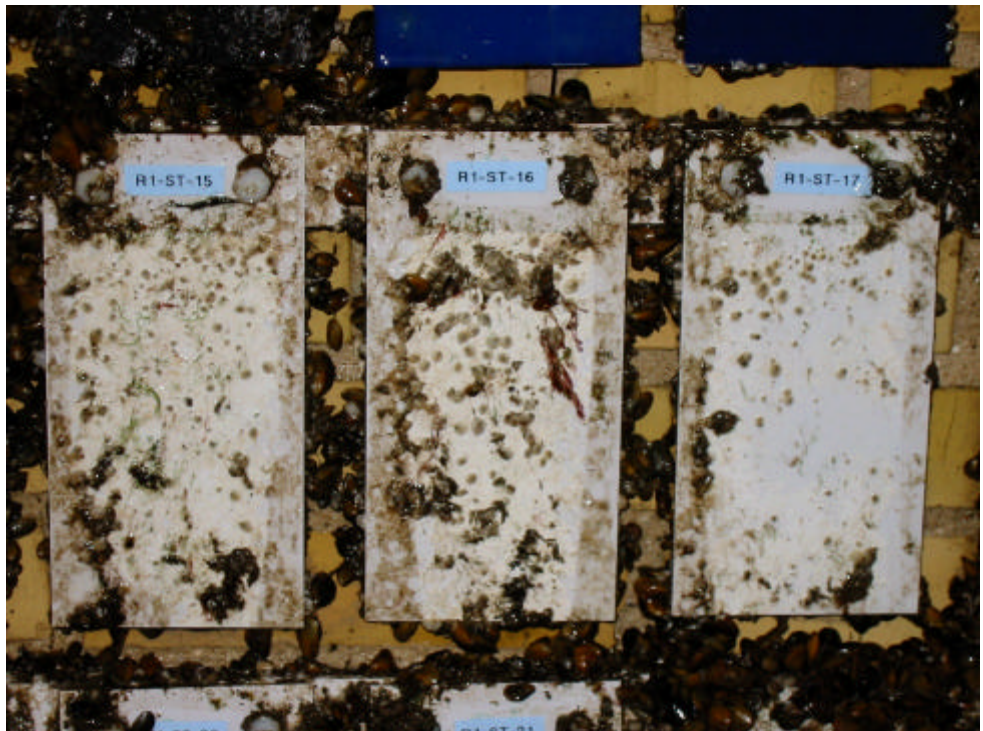
Billede D2 Helsingør 1-11-2002, før spuling af raft



Billede D3 Helsingør 1-11-2002, efter spuling som ved optagning af båd.



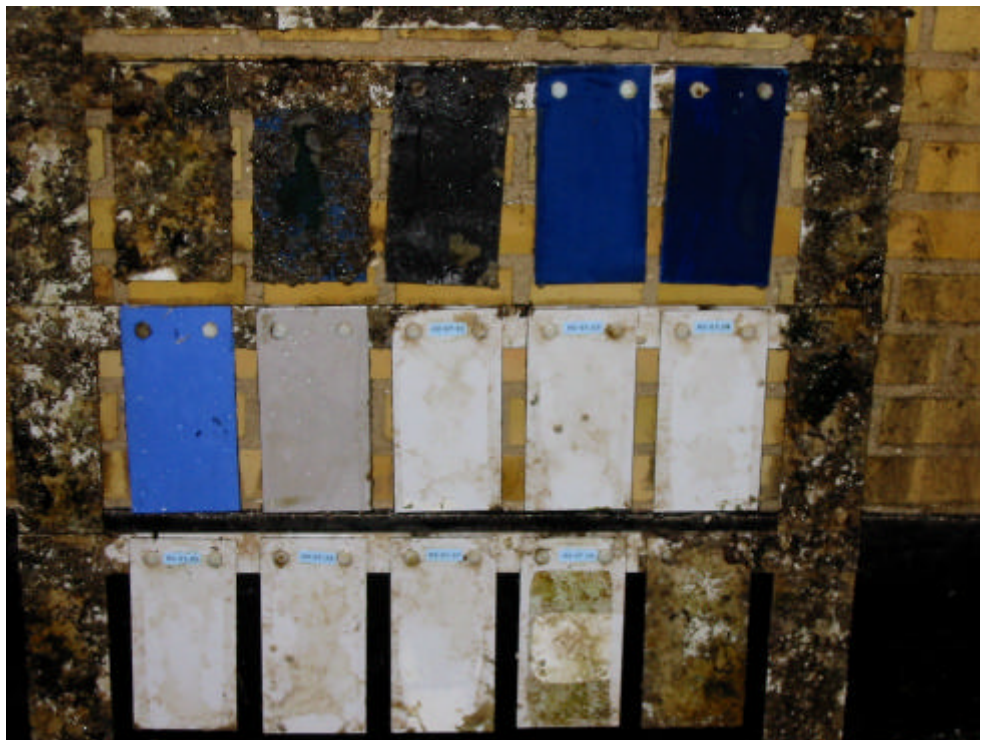
Billede D4 Helsingør 1-11-2002, efter spuling, zoom ind række 2, de tre sidste paneler



Billede D5 Kalvehave 1-11-2002, før spuling



Billede D6 Kalvehave 1-11-2002, efter spuling som ved optagning af båd



Billede D7 Kalvehave 1-11-2002, efter spuling, zoom ind række 3 venstre side



Bådejernes kommentarer

1.1.1 Kommentarer til påføringsegenskaberne

Nedenstående kommentarer er fra bådejere, der i påføringsskemaet har besvaret følgende spørgsmål:

- *Har du kommentarer til påføringsegenskaberne af den **primer** du har fået udleveret?*

- Rullesættet var ikke egnet – rullen gik i opløsning.
- Ingen.
- God dækkeevne – hurtig påføring – hurtig tørring.
- Primeren dækkede fint og var nem at påføre.
- Ok – dækker godt.
- Nem og hurtig at arbejde med, god dækkeevne. 1. lag påført med ”lakrulle”.
- Ok.
- God.
- Nem at påføre og god dækkeevne.
- Nem at påføre – dækker godt.
- Let at påføre, fint dækkende.
- Tidligere malet med Int. VC 17 m. teflon. Derfor anvendt Hempel 1-komponent primer.

- *Har du kommentarer til påføringsegenskaberne af **testbundmalingen**?*

Hård testmaling 2047:

- Nem at påføre.
- Virkede lidt tyk – sej- ikke helt let at påføre. Dækker ikke godt. Jeg gav kun et lag jf. instruktionerne, men det virkede ikke som om den dækkede helt.
- Tyk – ikke godt dækkende, svær at påføre.
- Malingen er vanskelig at røre ud til jævn konsistens – let at rulle på. Overrullet 2 gange umiddelbart efter hinanden for farvedækning.

Selvpolerende testmaling 2022:

- Meget klæbende – flæde gammel bundmaling af.
- Den var tykflydende og sværere at få til at dække – resultatet var en mere ujævn overflade i forhold til f.eks. Mille.
- nok. Fik kun en gang jf. instruktionen. Burde nok have 2x.
- Svær at påføre i ensartet lag, dårlig dækkeevne (gennemsigtig) påført med ”lakrulle”. Påførte 2. lag testbundmaling pga. dårlig dækkeevne.
- Fedtet – svær at påføre – dårlig dækkeevne.
- Dækker ikke, vanskelig at påføre (klæber) (opløser primer?).

- Klistret. River meget i rullen. Dækker ikke så godt. To lag for at dække. nogenlunde.
 - Dækker dårligt – vanskelig at påføre jævnt.
- Har du kommentarer til påføringsegenskaberne af **reference-/kontrolmalingen**?
- Meget tyndtflydende trods kraftig omrøring.
 - Ingen problemer.
 - Den var meget lettere at smøre på.
 - Ok.
 - Dækker bedre end testmalingen, men ikke helt. Ellers ok.
 - Påføringsegenskaberne ingen specielle kommentarer.
 - Tynd – normal at påføre.
 - Nem at rulle på – tendens til at dryppe fra rulle.

1.1.2 Kommentarer vedr. sejladsegenskaber og begroning

Nedenstående kommentarer er fra bådejere, der i resultatskemaet har besvaret følgende spørgsmål:

- Har bundmalingen været anderledes at sejle med end normalt? Hvis ja, hvordan?

- Har du andre kommentarer til hvordan det har været at sejle med testmalingen?

- Farthæmmende og usædvanlig smudset. Jotunstriben (kontrolmalingen) i midten perfekt (2047).
- Halvsløv båd, mærkelig, manglende acceleration og glid gennem vandet (2047).
- Virkede meget fint i starten – satte hastighedsrekord (motorbåd). Senere ekstremt meget begroning i vandlinien.
- Reduktion i bådens fart.
- Fartreduktion, forringede styreegenskaber.
- Trist.
- Begroning og rurer sænkede farten og manøvrevenen.
- Der var uforklarlige forandringer i farten og efter juli-august havde vi pludselig ikke samme højde til vinden som vi plejer – måske noget med flowet omkring kølen som var ret ru.
- Fedtet - meget begroning.
- En større reduktion af farten.
- Begroning – reduceret fart. BioLocus-malingen har ikke virket tilfredsstillende.

- Der var lange græshår hele vejen rundt i vandlinien

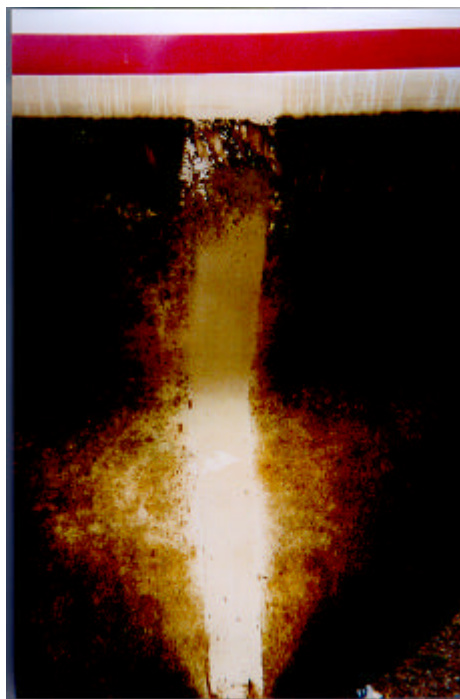
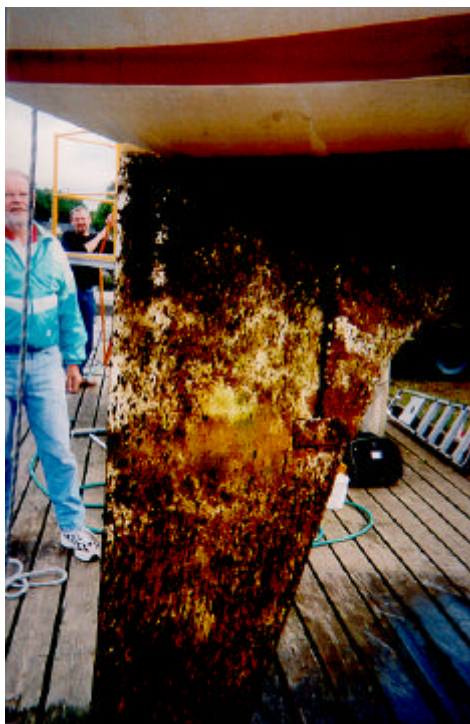
Billeder af testbåde – *ikke* vaskede

1.1 Første inspektion

Nedenfor vises billeder en række testbåde der ikke har været afvasket fra søsætning til inspektionstidspunktet i slutningen af juni.

1.1.1 Skive:

Inspektion på land den 30/6-03 af *Smaragd*. Båden er påført 2022 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (50-100%), alger (50-100%), rurer (0%), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slimet. (Båden udgik af forsøget 11. august pga. begroningsmængden).



1.1.2 Marselisborg:

Inspektion på land den 30/6-03 af *Yvette*. Båden er påført 2047 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (50-100%), alger (25-50%), rurer (0%), muslinger (0%). Kontrolmaling: Let slimet ellers ingen begroning.



1.1.3 Horsens

Inspektion på land den 30/6-03 af *Havnefogedens jolle*. Båden er påført 2022 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (25-50%), alger (50-100%), bryozoer (0%), rurer (50-100%), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slimet, men ingen rurer.



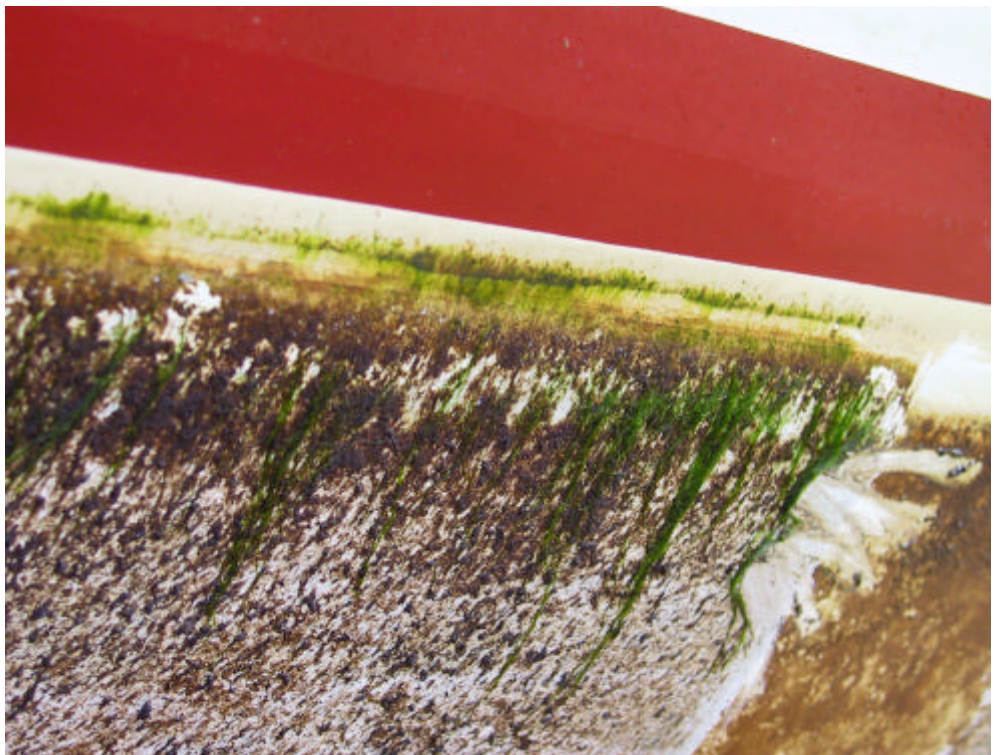
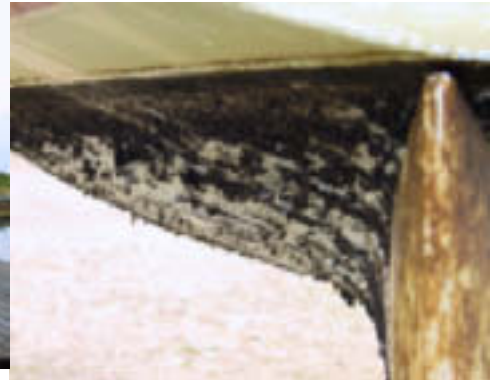
Inspektion på land den 30/6-03 af *Skagerak 21*. Båden er påført 2047 og har ikke være afvasket eller rensat før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (25-50%), alger (0-5%), bryzoer (0%), rurer (50-100%) (bunden var helt dækket af små rurer, som det fremgår af nærbilledet af roret), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slimet, men ingen rurer.



1.2 Anden Inspektion

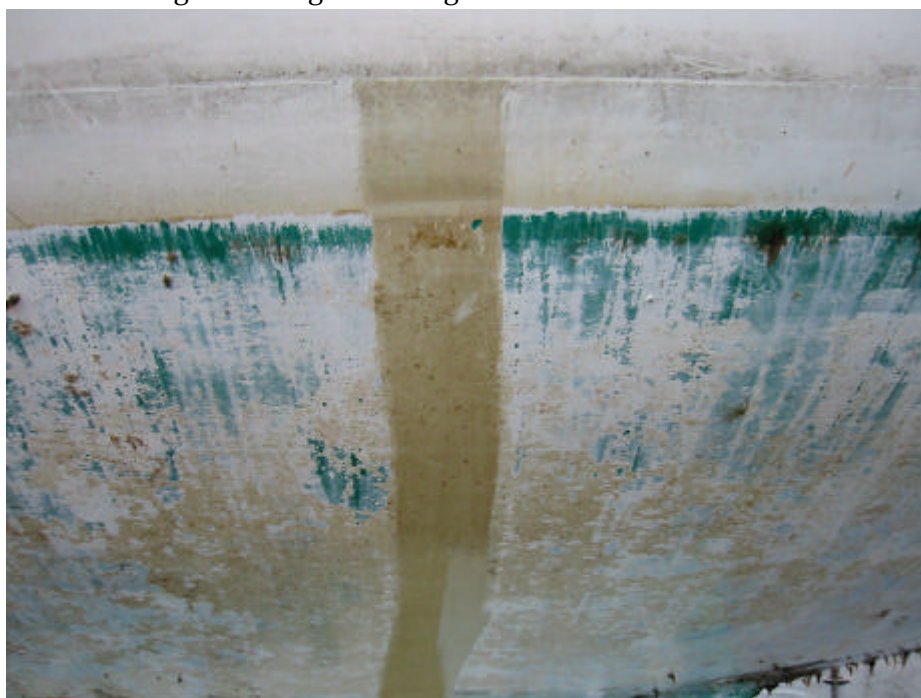
1.2.1 Skive

Inspektion på land den 21/8-03 af *ScanCap 99*. Båden er påført 2022 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionen. Begroning: Slim (50-100%), alger (50-100%), rurer (5-25%), muslinger (5-25%). Vandlinien: Grønlig algetråde. Kontrolmaling: Slimet og brunlig.



1.2.2 Helsingør

Inspektion på land den 1/9-03 af *B-31*. Båden er påført 2022 på bagbord og 2047 på styrbord, men ingen forseglende primer. Båden har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning på **2022**: Slim (25-50%) , alger (5-25%), bryzoer (5-25%), rurer (5-25%), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slimet og let brunlig.



Øverst: 2022. Malingen er poleret igennem ind til grøn Hard Racing. Ingen primer påført. Dette forstyrre resultatet, idet de grønne områder har stor antibegroningseffekt .
Nederst: 2047



1.3 Tredje inspektion – vinteroptagning

1.3.1 Kalvehave

Inspektion på land den 25/10-03 af *Jaguar 27*. Båden er påført 2022 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (50-100%), alger (25-50%), bryozoer (50-100%), rurer (0-5%), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slim.





1.3.2 Helsingør

Inspektion på land den 14/11-03 af *IF'er*. Båden er påført 2022 og har ikke være afvasket eller rensset før inspektionstidspunktet. Begroning: Slim (50-100%), alger (50-100%), bryozoer (50-100%), rurer (5-25%) (der hvor malingen ikke er poleret af, dvs. de hvide områder, er der ingen rurer), muslinger (0%). Kontrolmaling: Slim.





Billeder af testbåde – vaskede

I det følgende vises eksempler på både der har været vasket og rensset for begroning mellem søsætning og inspektionstidspunktet og eventuelt mellem de enkelte inspektioner.

1.1 Første inspektion

Skive

Inspektion på land den 16/6-03 af *Folkebåd*. Båden er påført 2047 og har inden inspektionen været afvasket med børste fra dækket: 4/6 og 11/6.
Begroning: Slim (25-50%), alger (50-100%), rurer (0%), muslinger (0%).
Kontrolmaling: lidt slimet (0-5%).



1.2 Anden inspektion

1.2.1 Helsingør

Inspektion på land den 18/8-03 af *Nexus 880*. Båden er påført 2022 og har inden inspektionen været afvasket med skrubbe: 31/7 og 8/8. Begroning: Slim (5-25%), alger (5-25%), rurer ("0%", der sad 5 på forkant af roret), muslinger (0%). Kontrolmaling: lidt slimet (0-5%).



1.2.2 Marselisborg

Inspektion på land den 15/9-03 af *Yngling*. Båden er påført 2047 og har inden inspektionen været afvasket med skrubbe: 1/7 og 23/8. Begroning: Slim (25-50%), alger (0-5%), rurer (0-5%), muslinger (0%), søpunge (5-25%). Bunden var ifølge brugerne helt dækket af søpunge inden afvaskningen den 23/8 – se nederste billede taget af brugerne if. afrensning 23/8). Kontrolmaling: lidt slimet (0-5%) nederst på køl. Bundmalingen er pletvis skrubbet helt af.



1.3 Tredje inspektion - vinteroptagning

1.3.1 Marselisborg

Inspektion på land den 15/11-03 af *Yngling 2*. Båden er påført 2022 og har inden inspektionen været afvasket med skrubbe: 1/7, 23/8 og 15/9. Malingen er stort set skrubbet/poleret væk - der er kun primer (grå områder) tilbage (se nederste billede).

Begroning: Slim (50-100%), alger (25-50%), rurer (50-100%), bryozøer (0-5%), muslinger (0%), søpunge (5-25%). Kontrolmaling: lidt slimet.



1.3.2 Kalvehave

Inspektion på land den 15/10-03 af *Junker 22*. Båden er påført 2022 og har inden inspektionen været afvasket i august måned med kost og grydesvampe. Begroning: Slim (50-100%), alger (25-50%), rurer (0-5%), bryzoer (50-100%), muslinger (0%), Kontrolmaling: Slimet og begyndende alger. Bundmalingen er pletvis skrubbet/poleret helt af.

