

Biološka razgradnja – pregled metoda*

KUI 32/2003

Prispjelo 21. studenog 2002.

Prihvaćeno 14. lipnja 2003.

L. Ulm, Ž. Pavlić, V. Schiesl, D. Puntarić i Z. Šmit

Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba, Mirogojska 16, Zagreb

Biološka razgradnja podrazumijeva proces u kojem se tvari razgrađuju u okolišu uz pomoć mikroorganizama, a kao posljedica takvog procesa nastaju jednostavnije komponente. Konačni proizvodi biološke razgradnje su voda, oksidi ugljika i drugih elemenata. Metode za određivanje biološke razgradnje propisane su Službenim listom Europske unije i Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO), koje za sada službeno prihvaća Republika Hrvatska. Odabir metoda za određivanje biološke razgradnje ovisi o svojstvima i sastavu ispitivanog uzorka. Ovisno o fizikalno-kemijskim karakteristikama kemijske tvari koja se ispituje (topljivost u vodi ili drugim otapalima, hlapljivost, stabilnost, adsorpcijska svojstva i sl.) odabire se metoda ispitivanja. Posebnu kategoriju čine kemijske tvari praktički netopljive u vodi (npr. maziva, mazive masti i maziva ulja koja su zapravo kompleksne smjese ugljikovodika) za koje je potrebna posebna priprema uzorka. Osnovni je princip svih metoda biološke razgradnje da se u vodeni (mineralni) medij određenog obujma koji sadrži miješanu bakterijsku kulturu dodaje odgovarajuća količina ispitivanog uzorka kao jedini izvor organskog ugljika. Razgradnja se prati u određenim vremenskim intervalima (najčešće 28 dana) i to mjerenjem CO₂, DOC ili O₂ (iz BPK ili KPK). Prema smjernicama Europske unije (OJ No L 110A/70 od 4. 5. 1993.) tvari se smatraju biološki razgradivima ako su na kraju pokusa (28. dan) postignute sljedeće udjelne masene razine razgradnje: 70 % u testovima koji se zasnivaju na otopljenom organskom ugljiku, odnosno 60 % u odnosu na teorijsku vrijednost u testovima koji se zasnivaju na potrošnji kisika ili količini nastalog ugljikovog dioksida.

Ključne riječi: Biološka razgradnja, kriteriji, odabir metode

Uvod

Opasnost koju kemijske supstancije organskog porijekla čine za okoliš može se definirati kao funkcija izloženosti u okolišu, toksičnosti kemikalije kao i vremena izlaganja. Radi prosudbe štetnog utjecaja kemijske supstancije na okoliš potrebno je imati informacije o njenoj približnoj koncentraciji u okolišu, poznavati njezina fizikalno-kemijska svojstva, zatim način uporabe i odlaganja te imati na umu karakteristike okoliša u koji ulazi kemikalija. Takva preliminarna prosudba opasnosti za okoliš može se naknadno promijeniti ukoliko je moguće predvidjeti tok interakcija u okolišu koji može dovesti do razgradnje kemijske supstancije u okolišu i/ili njene akumulacije u okolišu.¹ Procesi razgradnje i eventualno konačne eliminacije kemijske supstancije iz okoliša mogu biti biotički, koji uključuju prisustvo živih organizama i abiotički, koji podrazumijevaju djelovanje različitih fizikalno-kemijskih faktora. Razgradnja se može odvijati u bilo kojem mediju (zrak, voda, tlo), a ovisi o reaktivnosti kemijske supstancije i postojanju odgovarajućih fizikalno-kemijskih ili bioloških čimbenika koji mogu inducirati kemijsku promjenu (razgradnju). Od abiotičkih čimbenika ubraja se djelovanje kisika, vode, soli, minerala i različitih drugih materijala, kao i djelovanje sunčeve svjetlosti (fotoliza), dok se procesi biološke razgradnje odvijaju djelovanjem mikroorganizama (najčešće bakterija).

Biološka razgradnja proces je u kojem se tvari ili kemijske supstancije razgrađuju u okolišu uz pomoć mikroorganiza-

ma, a kao posljedica takvog procesa nastaju jednostavnije komponente. Konačni su proizvodi biološke razgradnje voda, oksidi ugljika i drugih elemenata. Proces biološke razgradnje ovisi o stvarnim uvjetima u okolišu, a od iznimne je važnosti prisustvo specifičnih bakterija. Većina je procesa biološke razgradnje aerobna, što znači da zahtijevaju postojanje kisika, iako takvi procesi mogu rezultirati i oslobođanjem kisika.²

Biološka razgradnja kemijskih supstancija u vodi

U vodenom okolišu biološka je razgradnja (uz hidrolizu) najuvjerljiviji način razgradnje kemijskih supstancija. S obzirom da je vodeni okoliš krajnji prihvatnik velikog broja kemijskih supstancija, postavljaju se sve veći zahtjevi u smislu biološke razgradnje takvih spojeva. Kako je vrlo često teško pomiriti povećane zahtjeve za izvodenjem takvih analiza i ograničena financijska sredstva, najprije se provodi preliminarno testiranje kemijskih supstancija ("screening") primjenjujući relativno jednostavne testove potpune biološke razgradljivosti, a ukoliko je potrebno mogu se provoditi i daljnja složenija ispitivanja biološke razgradljivosti. Stoga se predlaže hijerarhijski slijed ispitivanja i to: testovi brze biološke razgradljivosti, test inherentne biološke razgradljivosti i simulacijski testovi.

Testovi brze biološke razgradljivosti

Testovi na ovoj razini moraju biti dizajnirani tako da pozitivni rezultati nesumnjivo ukazuju da je kemijska supstancija potpuno biološki razgradljiva u okolišu i da nisu potrebna nikakva dodatna ispitivanja biorazgradljivosti kao i

* I. Hrvatska konferencija, Ekoinženjerstvo 2002, Plitvička jezera, 22. – 24. 10. 2002.

ispitivanja mogućeg utjecaja proizvoda biorazgradnje na okoliš. Međutim, u slučaju akcidentne situacije, tj. unošenja veće količine kemijske tvari u ekosustav, potrebna je nova prosudba opasnosti za okoliš bez obzira na činjenicu što je kemijska supstancija potpuno biološki razgradljiva. Negativni rezultati ne moraju nužno značiti da supstancija nije biološki razgradljiva, ali su potrebna daljnja testiranja. Radi međulaboratorijske usporedbe rezultata standardizirano je trajanje testiranja od 28 dana bez obzira na to što pojedinačne metode imaju različito vrijeme testiranja.

Test inherentne biološke razgradnje

Cilj je testova inherentne biološke razgradljivosti utvrditi može li se kemijska supstancija biološki razgraditi. Primarna biološka razgradnja može se odrediti samo specifičnim analizama, dok se konačna biološka razgradnja utvrđuje jednostavnijim, nespecifičnim analizama. Negativan rezultat testiranja na ovom stupnju ukazuje da nisu potrebna dodatna ispitivanja biološke razgradljivosti te da se pri prosudbi koncentracije kemijske supstancije u okolišu i njezinog utjecaja mora uzeti u obzir svojstvo biološke nerazgradivosti (perzistentnosti). U slučaju pozitivnog rezultata inherentne biološke razgradljivosti često je dovoljna samo činjenica da se kemijska supstancija neće zadržati neograničeno u okolišu, tj. da posjeduje određeni potencijal biorazgradljivosti. U slučaju kada je potrebna preciznija prosudba utjecaja takve kemijske supstancije na okoliš, potrebno je provesti daljnja ispitivanja. Također, ukoliko rezultati analiza ukazuju da se supstancija ne može razgraditi do konačnih razgradnih tvari, potrebno je uzeti u obzir mogući utjecaj razgradnih tvari na okoliš. Testovi inherentne biološke razgradljivosti nisu ograničeni vremenom procesa kao što je slučaj kod testova brze biološke razgradljivosti.

Testovi simulacije

Na temelju informacija o rasprostranjenosti kemijske supstancije u okolišu te njezine potencijalne toksičnosti određuje se područje najvećeg rizika u okolišu. U tom slučaju primjenjuju se adekvatni testovi simulacije kako bi se dokazao stupanj biološke razgradljivosti u relevantnim uvjetima okoliša.³

Pregled metoda biološke razgradnje

Izbor metoda i kriteriji

Metode za određivanje biološke razgradnje propisane su Službenim listom Europske unije i Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO), koje za sada službeno prihvaća Republika Hrvatska. Metoda za određivanje biološke razgradnje ovisi o svojstvima i sastavu ispitivanog uzorka. Ovisno o fizikalno-kemijskim karakteristikama kemijske supstancije koju ispituje (topljivost u vodi ili drugim otapalima, hlapljivost, stabilnost, adsorpcijska svojstva i sl.) odabire se metoda ispitivanja. Posebnu grupu čine kemijske supstancije praktički netopljive u vodi (npr. maziva, mazive masti i maziva ulja koja tvore kompleksne smjese ugljikovodika) pa ih je potrebno prethodno pripremiti prema uputama opisanim u ISO 10634.⁴ Na taj se način dobivaju emulzije i disperzije tih tvari čija se biološka razgradnja provodi u vodenom mediju. Osnovni je princip svih

metoda biološke razgradnje da se u vodeni (mineralni) medij određenog obujma koji sadrži miješanu bakterijsku kulturu dodaje odgovarajuća količina ispitivanog uzorka kao jedini izvor organskog ugljika. Razgradnja se prati tijekom određenog vremena (najčešće 28 dana) i to mjerenjem CO₂, DOC ili O₂ (iz BPK ili KPK).

Prema smjernicama Europske unije (OJ No L 110A/70 od 4. 5. 1993.) tvari se smatraju biološki razgradivima ako su na kraju pokusa (28. dan) postignute sljedeće udjelne razine razgradnje: 70 % u testovima koji se zasnivaju na otopljenom organskom ugljiku; odnosno, 60 % u odnosu na teorijsku vrijednost u testovima koji se zasnivaju na potrošnji kisika ili količini nastalog ugljikovog dioksida. Prema ovim kriterijima tvar je brzo biološki razgradiva kada tijekom pokusa dostigne 10 % razgradnje i u daljnjih 10 dana ("10-dnevni prozor") dostigne maksimum biološke razgradnje, tj. 70 % DOC ili 60 % CO₂, odnosno 60 % O₂.⁵

Metode biološke razgradnje u kojima se mjeri nastali CO₂

Određivanje biološke razgradnje pomoću modificirane metode Sturm⁶

Princip ovog testa je da se poznati obujam nacijskepljene mineralne podloge, koja ima odgovarajuću masenu koncentraciju ispitivanog uzorka (10–20 mg l⁻¹ otopljenog organskog ugljika, DOC, ili ukupnog organskog ugljika, TOC) kao jedini izvor organskog ugljika, prozračuje zrakom bez CO₂. Razgradnja se prati tijekom 28 dana određivanjem nastalog CO₂. Stupanj biološke razgradnje (%) izračuna se iz omjera količine CO₂ nastalog razgradnjom ispitivane tvari i teorijske količine CO₂. Za svaki pokus priprema se serija smeđih staklenih boca od 5 l, u kojima se nalazi po 3 l, mineralne podloge. U bocama se razvija CO₂ nastao biološkom razgradnjom ispitivanog uzorka i referentne tvari (Na-benzoat), kao i endogenom respiracijom bakterija u slijepoj probi. Kontrola toksičnosti (ispitivani uzorak i referentna tvar) i abiotska kontrola obavlja se također putem nastalog CO₂. Kao cjepivo upotrebljava se kontinuirano uzgojena miješana bakterijska kultura u laboratorijskom uređaju. Porijeklo kulture je filtrat zemlje i aktivni mulj iz uređaja za obradu otpadnih voda. Količina nastalog CO₂ (vezanog na barij-hidroksid, 0,0125 mol l⁻¹) određuje se titracijom s HCl-om (0,05 mol l⁻¹) uz indikator fenolftalein u dovoljno čestim vremenskim razmacima da se uobičaji krivulja biološke razgradnje iz koje se može prosuditi brzina i stupanj biološke razgradnje ispitivane i referentne tvari. Metoda se primjenjuje za uzorke koji su dobro ili slabo topljivi u vodi te za one koji imaju adsorpcijska svojstva.

Određivanje anorganskog ugljika u zatvorenim bočicama⁷

Princip "ISO 14593 – CO₂ headspace metode" je da se ispitivana tvar, kao izvor ugljika (2 – 40 mg l⁻¹ TOC) i energije, doda u nacijskepljeni mineralni medij u tzv. "headspace" bočice. Biološka razgradnja (mineralizacija do CO₂) prati se mjerenjem povećanja anorganskog ugljika tijekom 28 dana i izražava kao postotni udjel u odnosu na teorijsku količinu CO₂. Uvjeti testa slični su kao i kod "Sturm-testa", međutim, ovdje su bočice zatvorene pa je moguće testiranje i hlapljivih komponenata, a ni nema problema s eventualnim gubitkom CO₂. Za svaki pokus priređuje se

serija "headspace" bočica od 160 ml s butil-gumenim čepom i aluminijskom kapicom. U njima se mjeri CO₂ nastao biološkom razgradnjom ispitivane i referentne tvari (natrijev benzoat), zatim CO₂ nastao endogenom respiracijom bakterija (slijepa proba bez uzorka) te CO₂ u kontroli toksičnosti (uzorak i referentna tvar), kao i u kontroli abiotske razgradnje (uzorak i HgCl₂). U bočice se dodaje odgovarajući obujam osnovnih otopina određivane i referentne tvari, dok se slabo topljive tvari važu izravno u "headspace" bočice i to tako da su obujmi, odnosno odvage, ekvivalentne količini ukupnog organskog ugljika, tj. 10 – 15 mg l⁻¹ TOC. Kao cjepivo upotrebljava se kontinuirano uzgojena kultura iz laboratorijskog uređaja. Porijeklo kulture najčešće je aktivni mulj iz uređaja za obradu otpadnih voda. Pokus traje 28 dana, a mjerenje se provodi na dva načina: 1) zakiseljavanjem i mjerenjem iz plinske faze ili 2) zaluzivanjem, čime se nastali CO₂ iz plinske faze prevodi u tekuću i mjeri na TOC analizatoru.

CONCAWE – metoda "inherentne" biološke razgradnje uljnih proizvoda⁸

"CONCAWE – metoda "inherentne" biološke razgradnje uljnih proizvoda" kompatibilna je s "ISO 14593" osim što se ovdje rabi kultura mikroorganizama prethodno prilagođena na ispitivanu tvar i što test traje dulje, tj. 56 dana do tri mjeseca. Postupak izvođenja ovog testa potpuno je isti kao i prethodno opisan postupak "ISO 14593 – CO₂ headspace test", osim pripreme cjepiva. Cjepivo se priprema tako da se u kontinuirano uzgojenu kulturu iz laboratorijskog uređaja dodaje uzorak namijenjen za ispitivanje sljedećim redoslijedom: prvi dan se dodaje obujam/odvaga uzorka s 4 mg l⁻¹ TOC; sedmi i jedanaesti dan inkubacije dodaje se voda izgubljena isparavanjem i obujam/odvaga uzorka od 8 mg l⁻¹ TOC. Četrnaesti dan od prilagodbe mješovite kulture mikroorganizama na prethodno dodavan uzorak, tj. ujedno na dan postavljanja pokusa biološke razgradnje, tako priređeno cjepivo filtrira se i miješa do trenutka uporabe.

Metode biološke razgradnje u kojima se mjeri smanjenje kisika (putem BPK)

Metoda u začepljenim bocama⁹

Princip je metode u začepljenim bocama da se određivana tvar otopi u mineralnoj podlozi (obično 2–5 mg l⁻¹), nacijepi s mješovitom kulturom i inkubira u do vrha napunjenim, zatvorenim bočicama u mraku pri stalnoj temperaturi od 20 °C. Razgradnja se prati određivanjem otopljenog kisika tijekom 28 dana i izražava kao udjel količine kisika potrošene za oksidaciju određivane tvari (umanjen za potrošnju kisika u usporednom pokusu s cjepivom) i teorijske potrošnje kisika (TPK) ili kemijske potrošnje kisika (KPK). Metoda je prikladna za ispitivanje uzoraka koji su dobro ili slabo topljivi u vodi kao i kod uzoraka koji sadrže hlapljive komponente ili imaju adsorpcijska svojstva. Za pokus se pripremi usporedni niz bočica za određivanje BPK s određivanom i referentnom tvari. Pri tome treba pripremiti dovoljan broj bočica, uključujući i slijepu probe s cjepivom te kontrole toksičnosti i abiotske razgradnje kako bi se omogućila barem dvostruka mjerenja potrošnje kisika u željenim vremenskim razmacima, npr. nakon 3., 7., 14., 21. i 28. dana. Kako bi se osigurala aktivnost aerobnih mikroor-

ganizama, masena koncentracija otopljenog kisika tijekom pokusa ne smije pasti ispod 0,5 mg l⁻¹. To obično ograničava početnu koncentraciju određivane tvari na oko 2 mg l⁻¹. Za slabo razgradljive spojeve i spojeve s niskom TPK, početna masena koncentracija može biti 5–10 mg l⁻¹. U određenim vremenskim razmacima, tijekom 28 dana, uzimaju se najmanje po dvije bočice iz svake serije i određuje se količina otopljenog kisika pomoću kisikove elektrode ili titracijskom metodom po Winkleru.

Manometrijski respiracijski test¹⁰

Određivanje biološke razgradnje organske tvari aerobnim mikroorganizmima provodi se u statičnom, vodenom test sustavu. Početna koncentracija organske tvari, koja čini jedini izvor ugljika i energije, kreće se oko 100 mg l⁻¹ organskog ugljika. Inkubacija se provodi u mraku ili difuznom svjetlu, pri temperaturi između 20 °C i 25 °C i ne smije varirati više od ± 1 °C tijekom testa. Razgradnja se prati u razdoblju od 28 dana ili dulje, ako razgradnja organske tvari nije završena, mjerenjem biokemijske potrošnje kisika (BPK) u zatvorenom respirometru. Stupanj biološke razgradnje izražava se kao udjel izmjenjenog BPK i teorijske potrošnje kisika (TPK) ili kemijske potrošnje kisika (KPK). Ta se metoda primjenjuje kod testiranja uzoraka koji su slabo ili dobro vodotopljivi te za one koji imaju hlapljive komponente.

Dvofazni test zatvorenih bočica¹¹

Biorazgradnja organske tvari odvija se u ispitnoj podlozi uz pomoć aerobnih mikroorganizama. Organska tvar, čija je početna masena koncentracija 100 mg l⁻¹ teorijske potrošnje kisika (TPK), čini jedini izvor ugljika i energije u ispitnoj podlozi. Biološka razgradnja prati se određivanjem biokemijske potrošnje kisika (BPK) tijekom 28 dana i izražava usporedbom količine kisika potrošene za oksidaciju određivane tvari s teorijskom potrošnjom kisika (TPK) ili kemijskom potrošnjom kisika (KPK). Tom se metodom prati biološka razgradnja dobro i slabo vodotopljivih uzoraka.

Metode biološke razgradnje u kojima se mjeri smanjenje otopljenog organskog ugljika (DOC)

Metoda određivanja otopljenog organskog ugljika (DOC)¹²

Biorazgradnja organske tvari odvija se u ispitnoj podlozi uz pomoć aerobnih mikroorganizama. Organska tvar jedini je izvor ugljika i energije u ispitnoj podlozi, a početna masena koncentracija organskog ugljika kreće se od 10 mg l⁻¹ do 40 mg l⁻¹. Biološka razgradnja prati se mjerenjem otopljenog organskog ugljika (DOC) na početku i na kraju ispitivanja te u nekoliko intervala tijekom testiranja od 28 dana, a ukoliko je potrebno, razgradnja se može nastaviti i nakon 28. dana. Metoda je primjenjiva za vodotopljive uzorke.

Zahn-Wellensov test¹³

Određivanje biološke razgradnje organske tvari aerobnim mikroorganizmima provodi se u statičnom, vodenom test sustavu. Organska tvar jedini je izvor ugljika i energije u ispitnoj podlozi, a početna masena koncentracija organskog ugljika kreće se od 50 – 400 mg l⁻¹. Biološka razgradnja prati se mjerenjem otopljenog organskog ugljika (DOC)

ili kemijske potrošnje kisika (KPK) na početku i na kraju ispitivanja te u nekoliko intervala tijekom trajanja testa od 28 dana s mogućnošću produljenje testa i nakon 28. dana. Zahn-Wellens test primjenjuje se kod ispitivanja uzoraka topljivih u vodi.

Simulacijski testovi biološke razgradnje

*Polustatični test s aktivnim muljem*¹⁴

Ovdje se radi o polustatičnom vodenom test sustavu gdje su ispitivane organske tvari i lako biorazgradljiv organski medij glavni izvori ugljika i energije za cjepivo aerobnih mikroorganizama velike gustoće (aktivni mulj). Početna koncentracija organskog ugljika kreće se od 20 do 50 mg l⁻¹ DOC. Izmjena medija i ispitivane tvari provodi se svakodnevno, a mjerenje otopljenog organskog ugljika (DOC) obavlja se prije i nakon svake takve izmjene. Praćenje biološke razgradnje traje 26 tjedana.

*Simulacijski test aktivnog mulja*¹⁵

Kod tog se testa radi o kontinuiranom test sustavu gdje su organske testirane tvari i lako biorazgradljiv organski medij glavni izvori ugljika i energije za cjepivo aerobnih mikroorganizama (aktivnog mulja). Početna masena koncentracija organskog ugljika kreće se od 10 do 20 mg l⁻¹ DOC. Svakodnevno se obavlja izmjena medija i ispitivane tvari, kao i mjerenje otopljenog organskog ugljika (DOC) ili kemijske potrošnje kisika (KPK) influenta i efluenta. Praćenje biološke razgradnje traje 12 tjedana.

Testovi biološke razgradnje bez prisustva kisika (anaerobni)

*Anaerobni test biološke razgradnje*¹⁶

Biorazgradnja organske tvari odvija se u ispitnoj podlozi uz pomoć anaerobnih mikroorganizama. Organska je tvar jedini izvor ugljika i energije u ispitnoj podlozi, a početna masena koncentracija organskog ugljika kreće se od 20 do 100 mg l⁻¹. Biološka razgradnja prati se mjerenjem tlaka biološki oslobođenog plina (ugljkovog dioksida i metana) i otopljenog anorganskog ugljika (DIC) tijekom trajanja testa od 60 dana.

Zaključak

Testovi biološke razgradnje važan su element u prosudbi učinka kemijske supstancije na okoliš. U kombinaciji s testovima ekotoksičnosti i fizikalno-kemijskim karakteristikama daju korisne podatke o ponašanju u okolišu. Od iznimne je važnosti u ekotoksikološkim ispitivanjima obuhvatiti što širi spektar organizama, tj. različite organizacijske razine, od bakterija do beskralježnjaka i kralježnjaka. Također ne treba zanemariti intermedijare, nastale biološkom razgradnjom organske tvari, koji u toksikološkom smislu mogu

biti daleko štetniji od primarne kemijske supstancije i mogu se identificirati samo specifičnim analitičkim metodama, ali koje nisu dio standardnih testova biološke razgradnje.

Literatura

References

1. OECD Organization for Economic Co-operation & Development: OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. 1984.
2. Dow Corning Corp.: Environmental Degradation of PDMS. Fact Sheet Ref.No. 01-1049B-01, 1996.
3. J. Dragun, The Soil Chemistry of Hazardous Materials, The Hazardous Materials Control Research Institute, Silver Spring, Maryland, 1988.
4. ISO 10634: 1995 – Guidance for the preparation and treatment of poorly water soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium.
5. Official Journal of European Communities, L 110A/70, 04. 05. 1993.
6. ISO 9439: 1999 – Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Carbon dioxide evolution test.
7. ISO 14593: 1999 – Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test).
8. CONCAWE – a test method to assess the “inherent” biodegradability of oil products, report no. 99/59.
9. ISO 10707: 1994 – Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds – Methods by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test).
10. ISO 9408: 1999 – Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer.
11. ISO 10708: 1997 – Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds – Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test.
12. ISO 7827: 1994 – Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” aerobic biodegradability of organic compounds – Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC).
13. ISO 9888: 1999 – Water quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Static test (Zahn-Wellens method).
14. ISO 9887: 1992 – Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Semi-continuous activated sludge method (SCAS).
15. ISO 11733: 1995 – Water quality – Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Activated sludge simulation test.
16. ISO 11734: 1995 – Water quality – Evaluation of the ultimate biodegradability of organic compounds in digested sludge – Measurement of the biogas production method).

SUMMARY**Biodegradation – Methods Overview***L. Ulm, Ž. Pavlič, V. Schiesl, D. Puntarić, and Z. Šmit*

Biodegradation is a process during which chemicals and other substances are broken down into simple compounds or molecules by microorganisms and they become part of the environment. The final products of biological degradation are water and carbon oxides as well as the oxides of some other elements. Determination of biodegradation methods are regulated by the Official list of the EU and by the International Standardisation Organisation (ISO), and both are officially recognized by the Republic of Croatia.

The basic principle of all the biodegradability tests is, that a solution, or suspension, of the test substance in a mineral medium is inoculated and incubated under aerobic conditions, in the dark or in diffuse light. The biodegradation is monitored during a certain period of time (28 days usually) by measuring the levels of CO₂, DOC or O₂ (from BOD or COD).

Substances are considered readily degradable if the following criteria hold true:⁵

If in 28-day biodegradation studies the following levels of degradation are achieved:

- in tests based upon dissolved organic carbon: 70 %,
- in tests based upon oxygen depletion or carbon dioxide: 60 % of the theoretical maxima.

These levels of biodegradation must be achieved within 10 days of the start of degradation, which point is taken as the time when 10 % of the substance has been degraded.

Biodegradability tests are used to establish the biodegradability of chemical structures and to predict the biodegradation behaviour of a test material in a natural or technical environment. Therefore, as so many factors (aerobic/anaerobic test conditions; source and concentration of the microorganisms of the inoculum; concentration of the test material; possible toxic effects of the test material under the test conditions; physical and chemical properties and bioavailability of the test material; test duration) can influence or even exclude certain methods, it is necessary to have a sufficient number of different standardized test methods to allow the choice of the best one for the specific purpose.

The choice of a test depends normally on the purpose of testing or on legal requirements which have to be fulfilled. One strategy is to apply a simple low-cell density method. If a chemical degrades adequately, further testing is normally unnecessary. A low or zero value for biodegradation may be sufficient for the purpose. Otherwise the test could be repeated with an inoculum pre-exposed to the chemical, or a test with a higher cell density and a longer test period could be applied. Another strategy is to start with a high-density method to determine whether biodegradation is available at all, and to answer, if the test compound is easily biodegradable in environmental compartments by using a low-density method in the next step. The choice of a method also depends on the physical and chemical properties of the test chemical. Volatile test compounds can only be tested in closed systems such as ISO 10708.¹¹ In some cases it may be helpful to use an adapted inoculum. Pre-adaptation could be achieved using ISO 9887¹⁴ or ISO 9888¹³ followed by test methods using the measurement of biochemical oxygen demand (ISO 9408,¹⁰ ISO 10708¹¹ or carbon dioxide (ISO 14593).⁷

*Institute of Public Health, Mirogojska cesta 16,
10000 Zagreb, Croatia*

*Received November 21, 2002
Accepted June 14, 2003*