

heijmans

Bron: DALL-E

Met opmerkingen [JP1]: op te ruimen. Is dat spreektaal?



BIOLOGISCHE AFBRAAK VAN BANDENSLIJTAGEDEELTJES

Een onderzoek naar de potentie van biologische afbraak van bandenslijpsel voor bodemsanering.

Bastiaan van Stokkom

Februari 2024, Rosmalen

Heijmans Infra B.V., Rosmalen
Avans Hogeschool, Breda

heijmans

Deltares

avans
hogeschool

Biologische afbraak van bandenslijtagedeeltjes

*Een onderzoek naar de potentie van biologische afbraak van
bandenslijpsel voor bodemsanering.*

Auteur:

Bastiaan van Stokkom
Rosmalen, Februari 2024
bastiaan.vanstokkom@gmail.com
Studentnummer: 2153247

Afstudeeropdracht als onderdeel voor bachelors in Environmental Sciences for Sustainability, Ecosystems, and Technology (ESSET, of Milieukunde) aan Avans Hogeschool.

Bedrijfsinformatie:

Heijmans Infra B.V.
Graafsebaan 67, Rosmalen
Joris van Poppel
Senior-adviseur bodem
jpoppel@heijmans.nl

Onderwijsinstelling:

Avans Hogeschool (ATGM)
Lovensdijkstraat 61-63, Breda
Ilse Rovers
Afstudeerbegeleider
ca.rovers@avans.nl

Samenvatting

Slijtage van autobanden is verreweg de grootste bron van microplastics in Nederland. Er komt jaarlijks door verkeer naar schatting 10.000 ton bandenslijpsel terecht in de bodem, onze waterwegen en in de lucht (Verschoor et al.,). De overheid doet er nog (te) weinig aan om de verspreiding van deze microplastics tegen te gaan met als gevolg dat ons milieu vol raakt met deze deeltjes, met bewezen nadelige gezondheidseffecten voor mens en dier. Zo is bandenslijpsel verantwoordelijke voor 52% van de fijnstof emissies die vrijkomen bij autovervoer (Van Broekhuizen, 2022).

In dit onderzoek wordt er gekeken naar de potentie om bandenslijpsel op verschillende manier af te breken. Zo wil Heijmans, als maker van de gezonde leefomgeving, bijdragen aan het oplossen van dit opkomend milieuprobleem. In dit onderzoek naar de biologische afbreekbaarheid van bandenslijpsel wordt bandenslijpsel, afkomstig van Siba Autobanden en cryogeen gemalen en gezeefd tot een deeltjesgrootte, tussen de 80-500µm en werden vervolgens grondig gereinigd. Drie afbraakscenario's werden onderzocht: afbraak door *Nocardia sp.* DSM 6249, *Aspergillus niger* DSM 737, en micro-organismen uit een met bandenslijpsel vervuilde bodem, elk met specifieke voorbehandelingen.

De experimentele opzet omvat gesloten flessen voor GC-analyses en massa-bepalingen, en OxiTop® flessen voor BZV-metingen als maatstaf voor biologische afbraak, gebaseerd op een aangepaste standaard zoals omschreven in de NEN-EN ISO 14851:2019. Na een incubatieperiode van 60 dagen worden de rubberdeeltjes gereinigd en geanalyseerd om de massa-afname te bepalen, en wordt biologische afbraak berekend met behulp van BZV-data, die vergeleken werd met het theoretisch zuurstofverbruik. Aanvullend wordt gaschromatografie gebruikt om de zuurstofconsumptie te meten, waarmee de effectiviteit van biologische afbraakmethoden voor bandenslijpsel verder wordt geëvalueerd.

Uit dit onderzoek blijkt dat biologische afbraak van bandenslijpsel mogelijk is, met significante resultaten door zowel *Nocardia sp.* als het grondmonster, die een afbraak van respectievelijk 2,92% tot 5,00% én 3,60% tot 6,70% laten zien. Experimenten met de *Aspergillus niger* toonden echter mindere afbraak, met slechts 0,42% tot 0,63% afbraak. Opvallend was de negatieve interactie tussen de *Aspergillus niger* en de *Nocardia sp.*, wat resulteerde in een afbraak vergelijkbaar met de *Aspergillus niger*. Dit onderstreept dat, hoewel bandenslijpsel gedeeltelijk biologisch afbreekbaar is, de effectiviteit sterk afhangt van de gebruikte micro-organismen en hun interacties.

Het onderzoek toont aan dat het grondmonster uit verontreinigde bodem het meest effectief is in het afbreken van bandenslijpsel, wat aangeeft dat deze aanpak potentie heeft voor praktische toepassingen. Verdere optimalisatie van de omstandigheden en de inzet van specifieke micro-organismen zou de afbraaksnelheid kunnen verhogen. Een praktische toepassing hiervan is het gebruik in zelfreinigende afwateringsgoten, die bandenslijpsel, metalen en oliën opvangen. Deze goten, ontworpen om op lange termijn zonder menselijke interventie te functioneren, zouden door de inzet van micro-organismen een deel van het rubberslijpsel biologisch kunnen afbreken. Ook kan Heijmans investeren in alternatieven oplossingen die focussen op de bron aanpak, met bijvoorbeeld een autoband van duurzame materialen of door rubbers af te vangen zodra ze vrijkomen van het bandoppervlak.

Inhoudsopgave

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Inleiding..... | 1 |
| 1.1 Achtergrond | 1 |
| 1.2 Onderzoeksvraag..... | 1 |
| 1.2.1 Deelvragen..... | 1 |
| 1.3 Hypothese..... | 1 |
| 1.4 Leesgids | 2 |
| 2. Theoretisch kader..... | 3 |
| 2.1 Bandenslijpsel | 3 |
| 2.1.1 Vorming van bandenslijpsel..... | 3 |
| 2.1.2 Chemische samenstelling van autobanden | 4 |
| 2.1.3 Impact op de volksgezondheid | 5 |
| 2.2 Biologische afbreekbaarheid | 7 |
| 2.2.1 <i>Nocardia sp. DSM 6249</i> | 7 |
| 2.2.2 <i>Aspergillus niger DSM 737</i> | 7 |
| 2.2.3 Biologische afbreekbaarheidstest..... | 8 |
| 3. Materialen en methodes..... | 10 |
| 3.1 Voorbehandeling bandenslijtagedeeltjes | 10 |
| 3.2 Voorbehandeling micro-organismen | 10 |
| 3.3 Biologische afbraaktest..... | 11 |
| 3.4 Terugwinning van rubberdeeltjes..... | 13 |
| 3.5 Massa-afname bepalen | 13 |
| 3.6 Afbraak berekenen met biologisch zuurstofverbruik (BZV)..... | 14 |
| 3.7 Gas chromatograaf-analyses | 15 |
| 4. Resultaten | 16 |
| 4.1 Biologisch zuurstofverbruik | 16 |
| 4.1.1 <i>Nocardia sp.</i> | 16 |
| 4.1.2 <i>Aspergillus niger</i> - na 14 dagen | 17 |
| 4.1.3 <i>Aspergillus niger</i> - na 34 dagen | 18 |
| 4.1.4 <i>Aspergillus niger</i> & <i>Nocardia sp.</i> - na 34 dagen..... | 18 |
| 4.1.5 Grondmonster | 19 |
| 4.1.6 Berekende afbraak (% ThZV)..... | 20 |
| 4.2 Massa-afname..... | 21 |
| 4.3 Gas chromatograaf | 23 |
| 4.4 Vergelijken..... | 24 |
| 5. Conclusie | 25 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6. Discussie | 26 |
| 7. Advies & Aanbevelingen | 27 |
| 7.1 Advies..... | 27 |
| 7.2 Aanbevelingen | 27 |
| 8. Dankbetuigingen..... | 29 |
| 9. References..... | 30 |
| Bijlagen..... | 33 |
| B1 - Recepten media - Aangeleverd door DSMZ | 33 |
| B1.1 - 53. CORYNEBACTERIUM BROTH (opkweek <i>Nocardia sp.</i>)..... | 33 |
| B2.2 - 457. BRUNNER MINERAL MEDIUM (groeï medium voor alle experimenten) | 33 |
| B2 - Controle experimenten..... | 34 |
| B2.1 - Controle experiment - Massabepalingen..... | 34 |
| B2.1.1 - Filtratie met 0,22 µm Millipore membraam filter met vacuüm filtratie met trechter, Microfil® 3 heads filtration. | 34 |
| B2.1.2 - Filtratie met 8,0 µm Millipore membraam filter met vacuüm filtratie met andere filtratie opstelling, Nalgene® 300-4000 Reusable 1L Vacuum Filter Holder with Funnel & Receive | 34 |
| B2.1.3 - Büchner trechter met 8,0 µm Millipore membraam filter. | 35 |
| B2.2 - Controle experiment - Oplossen van biomassa | 36 |
| B2.2.1 - Oplossen in 15% Waterstofperoxide (H ₂ O ₂) | 36 |
| B2.2.2 - Oplossen in 95% Aceton | 36 |
| B2.2.3 - Koken in natronloog (1M NaOH)..... | 37 |
| B3 - Sustainability - assignment 4 voor Avans..... | 38 |

Figuren- en tabellenlijst

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 1 - Bandenslijpsel emissies van verschillende voertuig types (Jekel, 2019). | 3 |
| Figuur 2 - Voorgestelde splitsing van poly(cis-1,4-isopreen) door Lcp enzymen van de Nocardia Sp (Röther et al., 2016)..... | 7 |
| Figuur 3 - Schematische weergave van de OxiTop® fles..... | 9 |
| Figuur 4 - De <i>Nocardia sp.</i> (links) en <i>Aspergillus niger</i> (rechts) na 14 dagen in de broedstoof. De Nocardia vormt een biofilm op de bodem van de erlenmeyer en de Aspergillus vormt de typische schimmelballen. | 10 |
| Figuur 5 - Gebruikte proefopstelling; alle test en controle flessen in de schudbroedstoof op 30 graden Celsius en 100 rpm. | 13 |
| Figuur 6 - Éénpuntsijlijn voor zuurstofconcentratie bepaling | 15 |
| Figuur 7 - <i>Nocardia sp.</i> BZV waardes van de controle en test fles over tijd. | 17 |
| Figuur 8 - A. Niger na 14 dagen BZV waardes van de controle en test fles over tijd. *waarschijnlijk onbetrouwbare resultaten..... | 17 |
| Figuur 9 - A. Niger na 34 dagen BZV waardes van de controle en test fles over tijd. | 18 |
| Figuur 10 - Combinatie A. Niger & <i>Nocardia sp.</i> BZV waardes van de controle en test fles over tijd..... | 19 |
| Figuur 11 - Grondmonster BZV waardes van de controle en test fles over tijd. | 19 |
| Figuur 12 - Grafiek met berekende biologische afbraak van bandenslijpsel van de 7 geteste scenario's. *De eerste test met de <i>Aspergillus niger</i> is onbetrouwbaar. | 21 |
| Figuur 13 - Filter met verontreiniging van het grondmonster (links) vergeleken met die van <i>Nocardia sp.</i> (rechts) | 22 |
| | |
| Figuur B1 - geteste Microfil® 3 heads filtratie opstelling..... | 34 |
| Figuur B2 - Geteste Nalgene® Reusable 1L Vacuum Filter vacuümfiltratie opstelling en membraamfilters | 34 |
| Figuur B3 - Aan de onderzijde van de trechter blijven enkele bandenslijtagedeeltjes plakken. Deze konden na drogen zorgvuldig weggeveegd en opgevangen worden..... | 35 |
| Figuur B 4 - Voorbeeld van een geteste Büchner trechter..... | 35 |
| | |
| Tabel 1 - Typische samenstelling van banden op de weg uitgedrukt in gewichtspercentage (% w/w), functie en biologische afbreekbaarheid van de onderdelen. Geadapteerd van: (Jekel, 2019; Tan, et al., 2023; Nielsen et al., 2023)..... | 4 |
| Tabel 2 - Overzicht van schadelijke stoffen die uitlogen uit bandenslijpsel, geadapteerd van (Tan et al., 2023)..... | 6 |
| Tabel 3 - Flessen samenstellingen gebruikt tijdens het experiment voor massabepaling (boven) en BZV (onder)..... | 12 |
| Tabel 4 - Resultaten van de massametingen met gemiddeld massaverlies met standaard afwijking van $1,96 \pm 1,75$ mg van de controle massabepaling, zie tabel B1 in de bijlage..... | 22 |
| Tabel 5 - Resultaten GC-analyse test flessen met O2 verbruikt | 23 |
| Tabel 6 - Resultaten GC-analyse controle flessen met O2 verbruikt..... | 23 |
| Tabel 7 - Resultaten van de GC-analyses met berekend % afbraak van het bandenslijpsel..... | 23 |
| Tabel 8 - Alle (betrouwbare) resultaten van de verschillende meet methoden uitgedrukt in % afbraak. *n/a, onbetrouwbare resultaten door contaminatie van het Brunner medium of rubberslijpsel. | 24 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Vergelijking 1 - Voor de bepaling van gewichtsverlies (in %) | 14 |
| Vergelijking 2 - Voor de bepaling van de specifieke BZV van de OxiTop® flessen | 14 |
| Vergelijking 3 - Voor de bepaling van de massa-afname (in %) op basis van het BZV | 14 |

Begrippen- en afkortingenlijst

| Begrip | Afkorting | Definitie |
|---------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biochemisch zuurstofverbruik | BZV | De hoeveelheid zuurstof die een monster verbruikt voor oxidatie processen. Uitgedrukt in milligram zuurstof per liter monster |
| Enzym | - | Enzymen maken de afbraak van diverse stoffen mogelijk of versnellen de reactie. |
| Fijnstof | PM10 & PM2.5 | Fijnstof kleiner dan 10 en 2,5 micrometer dat lang in de lucht blijft door het kleine formaat. |
| Laminaire flowkast | - | Biologische veiligheidskast, in deze kast kan veilig met micro-organismen gewerkt worden. De verspreiding van de organismen wordt beperkt door een deken van lucht. |
| Latex clearing protein | Lcp | Specifiek enzym dat de <i>Nocardia sp.</i> uitscheidt die de afbraak van latex rubber in gang zet. |
| Manometer | - | Meetinstrument om druk te meten. |
| OxiTop® | - | Speciale manometer die druk bijhoudt over tijd van WTW™ |
| Rioolwaterzuiveringsinstallatie | RWZI | In een RWZI wordt rioolwater gezuiverd voordat dit naar het oppervlaktewater stroomt. |
| Theoretisch zuurstofverbruik | ThZV | Het zuurstofverbruik dat verwacht is nodig te zijn om een stof te oxideren. |
| Tire wear particle | TWP | Engels term voor bandenslijpsel, microplastics die vrijkomen van het bandenloopvlak door slijtage. |

1. Inleiding

1.1 Achtergrond

Een gezonde leefomgeving is tegenwoordig een steeds belangrijker thema, waarbij de aandacht voor microplastics opvallend toeneemt. Microplastics, synthetische polymeerdeeltjes kleiner dan vijf millimeter, belanden zowel direct als indirect in ons milieu. Deze deeltjes zijn onder te verdelen in primaire microplastics, die direct in het milieu terechtkomen, en secundaire microplastics, die ontstaan door afbraak of slijtage van grotere plastic objecten. Met name secundaire microplastics, verantwoordelijk voor meer dan 60% van de totale microplasticemissies, vormen een complex probleem. Ze zijn moeilijk te reguleren omdat ze afkomstig zijn van alledaagse voorwerpen die niet zomaar verboden kunnen worden (Laskar & Kumar, 2019).

Dit onderzoek focust op bandenslijtage, de grootste secundaire bron van microplastics in ons milieu, ook bekend als tire wear particles (TWP) (Wagner et al., 2018). Hoewel autobanden deels uit natuurrubber bestaan, bevat een significant deel synthetisch rubber, waardoor bandenslijpsel als microplastic wordt beschouwd. Tijdens het gebruik van een autoband slijt gemiddeld tien tot twintig procent van het totaalgewicht af, wat in Nederland leidt tot een jaarlijkse emissie van ongeveer 17.000 ton microscopisch bandenslijpsel. Veertig procent hiervan blijft plakken aan het asfalt of komt vast te zitten in zeer open asfaltbeton (ZOAB), waardoor de verspreiding beperkt blijft. Desondanks wordt jaarlijks zo'n 10.000 ton bandenslijpsel in het milieu verspreid, voornamelijk in de bodem, waardoor de tijd dringt om dit opkomend milieuprobleem aan te pakken (Hoeke et al., 2024).

1.2 Onderzoeksvraag

Heijmans wil zich als de maker van een gezonde leefomgeving bijdragen aan het oplossen van dit opkomend milieuprobleem. Het doel van dit onderzoek is om inzicht te verschaffen in manieren waarop de biologische afbraak van microrubber bandenslijpsel getest en versneld kan worden. De onderzoeksvraag is als volgt:

Is het mogelijk bacteriën, schimmels of bodemmicrobiële gemeenschappen te gebruiken om bandenslijpsel af te breken onder ideale omstandigheden in een lab gedurende zestig dagen, en wat is de beste manier om dit te toetsen?

1.2.1 Deelvragen

1. Wat is de gemiddelde samenstelling van stoffen in bandenslijpsel?
2. Wat zijn de gevolgen van bandenslijpsel emissies op de volksgezondheid en milieu?
3. Kunnen micro-organismen bandenslijpsel afbreken, en zo ja welke?
4. Wat is de effectiviteit van diverse micro-organismen om bandenslijpsel af te breken?
5. Welke methodes zijn het meest geschikt om de biologische afbraak van microplastics te toetsen?

1.3 Hypothese

De nulhypothese, H_0 , suggereert dat er geen significante afbraak plaats vindt van het bandenslijpsel gedurende de zestig dagen, hierdoor sterven de micro-organismen af en vindt er geen statistisch significante massa-afname plaats van het rubberslijpsel.

De alternatieve hypothese, H_a , suggereert dat er wel significante afbraak van rubber is. Wat betekent dat micro-organismen ingezet kunnen worden om bandenslijpsel af te breken op lab schaal.

1.4 Leesgids

Hoofdstuk 1: Inleiding

Dit hoofdstuk vormt de inleiding van het verslag, waarin de aanleiding voor het project wordt beschreven, inclusief relevante achtergrondinformatie. Verder worden de centrale onderzoeksvragen, deelvragen en de hypothese gepresenteerd.

Hoofdstuk 2: Theoretisch Kader

In dit hoofdstuk wordt het probleem van bandenslijtagedeeltjes in het milieu uitgediept. Er wordt uiteengezet hoeveel bandenslijtagedeeltjes er jaarlijks in het milieu terechtkomen, welke potentiële negatieve effecten dit heeft op de volksgezondheid en wat de chemische samenstelling van deze deeltjes is. Daarnaast verschaft dit kader essentiële achtergrondinformatie over biologische afbreekbaarheidstesten, inclusief de werking ervan, en verduidelijkt het de principes van biologische afbraak door micro-organismen. Dit vormt de basis voor het onderzoek naar de biologische afbraak van bandenslijtagedeeltjes.

Hoofdstuk 3: Methodologie

Hier worden de methodologische stappen beschreven die in het laboratorium zijn genomen om de biologische afbraak van de deeltjes te onderzoeken. Dit omvat de selectie en opkweek van micro-organismen, de opzet van de test- en controleflessen en de analyse van de experimentele resultaten, compleet met een overzicht van alle gebruikte formules.

Hoofdstuk 4: Resultaten

Dit hoofdstuk presenteert de bevindingen van het experiment, inclusief het waargenomen massaverlies gedurende de incubatieperiode met verschillende micro-organismen. Ook worden resultaten die afwijken van de verwachtingen nader toegelicht.

Hoofdstuk 5: Conclusie

De conclusies van het onderzoek worden hier weergegeven, met antwoorden op de hoofd- en deelvragen. Belangrijke ontdekkingen en resultaten van de studie worden kort samengevat, en relevante observaties worden besproken.

Hoofdstuk 6: Discussie

In de discussie wordt de validiteit van het onderzoek beoordeeld. De resultaten worden geïnterpreteerd, en nieuwe inzichten komen aan bod. Ook worden onverwachte uitkomsten besproken. Verder worden de implicaties van het onderzoek aangekaart en wordt gesuggereerd welke vervolgstappen noodzakelijk zijn om de emissie van bandenslijpsel aan te pakken.

Hoofdstuk 7: Aanbevelingen

Als afsluiting worden aanbevelingen gedaan over potentiële vervolgacties die Heijmans zou kunnen ondernemen. Dit hoofdstuk beoogt richting te geven aan toekomstige inspanningen om de problematiek rondom bandenslijpsel effectief aan te pakken.

Hoofdstuk 8: Referenties

Het referentie hoofdstuk geeft alle gebruikte literatuur aan in APA-stijl.

2. Theoretisch kader

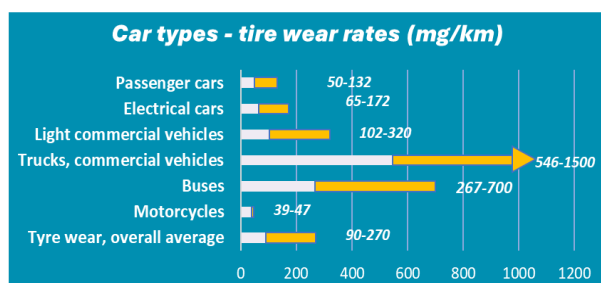
Dit theoretisch kader biedt een grondige analyse van de slijtage van autobanden, inclusief deeltjesgrootte, gevolgen voor volksgezondheid en de verspreiding van deze componenten in het milieu. De nadruk ligt op het begrijpen van de gezondheidsrisico's en milieueffecten van specifieke chemische bestanddelen. Zowel acute als chronische gezondheidsrisico's van de bestanddelen worden genoemd zowel als de potentie voor biologische afbreekbaarheid van deze stoffen. Deze inzichten zijn van cruciaal belang voor het ontwikkelen van doeltreffende milieustrategieën. In de volgende secties worden de mechanismen van slijtage, de chemische samenstelling van autobanden en schadelijke stoffen die kunnen uitloggen uit bandenslijpsel nader onderzocht. Ook wordt het verwachte proces van de biologische afbraak van de rubber deeltjes verder toegelicht.

2.1 Bandenslijpsel

Bandenslijpsel, in het Engels tire wear particles of TWP genoemd, zijn kleine fragmenten die vrijkomen door slijtage en degradatie van het bandenprofiel tijdens het rijden. Ze komen door diverse mechanische en chemische processen vrij in ons milieu, waar de deeltjes jaren kunnen blijven zonder significante afbraak.

2.1.1 Vorming van bandenslijpsel

De slijtage van het loopvlakmateriaal van een band treedt op als gevolg van de wrijving tussen de auto en het wegdek. Hierdoor zijn er een scala aan variabelen die de mate van slijtage beïnvloeden. Het type wegdek, het type band, weersomstandigheden, het gewicht van het voertuig en het rijgedrag van de bestuurder dragen bij aan de intensiteit van de slijtage. Figuur 1 hieronder geeft een overzicht van de mate van loopvlaksluitage van verschillende voertuigtypes. De figuur laat zien dat gemiddeld 90-270 mg bandenslijpsel per gereden kilometer in ons milieu terecht komt (Jekel, 2019).



Figuur 1 - Bandenslijpsel emissies van verschillende voertuig types (Jekel, 2019).

Bandenslijpsel komt vrij door verschillende mechanische en chemische processen wanneer de band in contact komt met het wegdek. Het eerste proces is abrasie, waarbij de mechanische wrijving van de band op het wegdek zorgt voor een geleidelijke afschuring van het loopvlak. Dit leidt tot kleine rubberdeeltjes die op de weg, in de berm of in de lucht terechtkomen; de deeltjesgrootte kan variëren van een millimeter tot minder dan een micrometer (Panko et al., 2018).

De tweede belangrijke vorm van slijtage is thermische slijtage. Dit treedt op wanneer de wrijving tussen band en wegdek lokale hotspots van extreme hitte veroorzaakt. Als gevolg van deze fysische slijtage verdampt een deel van het loopvlak, dat later weer neerslaat in de lucht. Dit proces resulteert in de vorming van de kleinste deeltjes, en bovendien leidt deze

Met opmerkingen [JP2]: de figuur staat op de verkeerde plek in de tekst

vorm van slijtage tot chemische veranderingen in het bandenslijpsel. Het rubber wordt dusdanig verhit dat vulkanisatieverbindingen verbroken kunnen worden, waardoor de biologische afbreekbaarheid naar verwachting lichtelijk toe zal nemen (Van Broekhuizen, 2022).

De laatste belangrijke vorm is vermoeidheidslijtage, die optreedt wanneer de autoband door de jaren heen herhaaldelijk wordt belast en vervormd. Deze belasting vindt plaats wanneer het voertuig sterk van snelheid verandert, een bocht neemt of door het gewicht van het voertuig. Het voortdurende rekken en buigen van het rubber leidt tot vermoeidheid en slijtage. De deeltjesgrootte die hierbij ontstaat is vergelijkbaar met die van abrasie.

Al met al resulteren deze processen in de vorming van rubberdeeltjes met een grootte variërend van 5,6 nm tot 350 µm. Het merendeel van deze deeltjes valt tussen de 20 en 220 µm (Jekel, 2019) (Tan et al., 2023). Wanneer de microdeeltjes vrijkomen, kunnen sommige deeltjes zich vastplakken aan andere auto-emissies (zoals remslijtagedeeltjes) en asfaltdeeltjes van het wegdek, waardoor samen 'banden- en wegen slijtagedeeltjes' (of TRWP's) worden gevormd. (Jekel, 2019)

2.1.2 Chemische samenstelling van autobanden

Bandenslijtagedeeltjes worden door hun samenstelling gezien als microplastics, microplastics is een term voor alle door de mens gemaakte polymeer deeltjes die kleiner zijn dan 5 millimeter. Gezien de slijtagedeeltjes voor een groot deel uit synthetische rubbers bestaat, valt ook dit onder de term microplastic. Echter is het door de samenstelling van verschillende stoffen in een band moeilijker om de biologische afbraak in kaart te brengen dan bij materialen die enkel uit polymeren bestaan. Om een beter beeld te krijgen van de biologische afbreekbaarheid van een autoband is het dus belangrijk om te begrijpen wat de chemische samenstelling is van een typische auto of vrachtwagenband. De chemische samenstelling van banden betreft onder andere polymeren, vulstoffen, oliën, vulkanisatiemiddelen en additieven om de banden een langer mee te laten gaan, zie tabel 1. De tabel geeft ook een overzicht over de biologische afbreekbaarheid van de individuele stoffen. Dit geeft overzicht welke stoffen in het bandenslijpsel waarschijnlijk wel, en welke niet afbreken wat belangrijk is om een beeld te schetsen van de mate van degradatie.

Tabel 1 - Typische samenstelling van banden op de weg uitgedrukt in gewichtspercentage (% w/w), functie en biologische afbreekbaarheid van de onderdelen. Geadapteerd van: (Jekel, 2019; Tan, et al., 2023; Nielsen et al., 2023).

| Categorie | Typische samenstelling | Functie | Afbreekbaarheid | Inhoud (% w/w) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| Rubber polymeren | Natuurrubber | Elasticiteit, flexibiliteit en grip op de weg | Goed | ~19% |
| | Synthetische rubbers (Isopreenrubber, styreen-butadieenrubber, butadieenrubber) | | Slecht | ~24% |
| Vulstoffen | Carbon black, silica, silaankoppelingsmiddelen | Versterkt het loopvlak en verbetert slijtvastheid | Erg Slecht | 19-35 |
| Oliën en weekmakers | Minerale oliën, milde oplosmiddelen, behandelde destillatie-aromatische extracten | Verbeterd structurele sterkte van de band | Matig | 12-20 |

Met opmerkingen [JP3]: Je hebt in de tabel een aantal categorieën aan stoffen aangegeven waaruit een band kan bestaan. Kun je nog een kolom toevoegen om per categorie aan te geven welke bijdrage deze stof levert aan de band?

| | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------|------|
| Vulkanisatiemiddelen | Zwavel, zinkoxide, stearinezuur, zinkstearaat | Beschermst tegen slijtage en afbraak | Niet | 2-5 |
| Andere additieven | Antioxidanten, antiozonanten, conserveermiddelen, droogmiddelen, wassen, verwerkingshulpmiddelen | Mogelijk toxisch | Slecht | 5-10 |

De biologische afbreekbaarheid van de individuele stoffen varieert, de verschillende stoffen veranderen de totale afbreekbaarheid van het bandenslijpsel. Het kan dus zo zijn dat de samenvoeging van de stoffen, het bandenslijpsel moeilijker afbreekbaar maakt dan de individuele componenten op zich (Nielsen et al., 2023).

2.1.3 Impact op de volksgezondheid

De impact op de volksgezondheid van bandenslijtage kan in twee categorieën worden ingedeeld: fijnstofemissies en het uitlogen van gevaarlijke stoffen. Deeltjes kleiner dan 10 micrometer worden PM10, of fijnstof, genoemd en worden beschouwd als de schadelijkste stoffen die vrijkomen uit de uitlaat van een auto omdat ze door hun formaat langdurig in de lucht blijven zweven en gemakkelijk kunnen worden ingeademd door mens en dier (Panko et al., 2018). Het onderwerp van fijnstof emissies als gevolg van bandenslijtage komt in recente jaren steeds maar aan het licht. Toch blijkt het onderzoeken van microplastics in lucht een uitdaging (Kim et al., 2022).

Bandenslijpsel emissies variëren in grootte op basis van rijgedrag, voertuiggewicht, wegdek en bandentype, maar gemiddeld komt er tussen de 3,5-13 mg PM10 per gereden kilometer vrij (Panko et al., 2018). Voor uitlaatemissies bestaan er Europese normen die fijnstofemissies reguleren. De Euro 6 is de meest recente Euronorm die deze uitlaatemissies beperkt tot 4,5 mg PM10 per kilometer (Carrington, 2022). Echter komt er bij normaal rijgedrag van een personenauto slechts 0,2 mg PM10/km vrij (Carrington, 2022). Bandenslijpsel PM10-emissies liggen daarmee twintig keer zo hoog als die van uitlaatemissies, en zijn zelfs hoger dan de maximaal toegestane uitlaatemissies opgesteld in de Euro 6. Zo is bandenslijpsel verantwoordelijk voor meer dan 52% van totale fijnstof emissies afkomstig van autovervoer. Toch wordt er nog niks gedaan om deze emissies te beperken. Dit betekent dat de luchtkwaliteit in stedelijke gebieden sterk verslechtert met fijnstof mede of met name door bandenslijtage, wat leidt tot long- en vaatziekten, astma, COPD en meer (Tan et al., 2023).

Minder dan 10% van de emissies van bandenslijpsel komt dus als fijnstof in de lucht terecht. Het overgrote deel belandt in de wegberm en waterwegen, waar het langzaam tot niet afbreekt en het volgende risico voor de volksgezondheid vormt: het uitlogen van schadelijke stoffen (Tan et al., 2023). Bandenrubber zit vol met additieven die bedoeld zijn om de band sterker, stiller en elastischer te maken. Echter zijn een aantal van deze additieven schadelijk voor de volksgezondheid. Tabel 2 geeft een overzicht van de verschillende stoffen die uitlogen uit bandenslijpsel, met acute en chronische gezondheidsrisico's. Een van de recent ontdekte alarmerende stoffen is 6PPD-quinon; dit is een anti-ozonant die dient om de banden te beschermen tegen blootstelling aan ozon. Toen deze stof werd aangetoond in een rivier langs een snelweg in Amerika, werd het al snel gelinkt aan de sterfte van de zalmpopulatie in de rivier. De effecten van deze stof op zoogdieren worden nog onderzocht (Tian et al., 2024).

Met opmerkingen [JP4]: of eerst in de wegberm en dan in de waterwegen?

Tabel 2 - Overzicht van schadelijke stoffen die uitloggen uit bandenslijpsel, geadapteerd van (Tan et al., 2023)

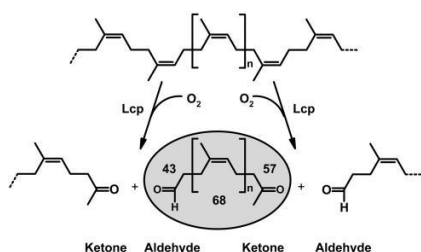
| Bestanddeel | Acute Gezondheidsrisico's | Chronische Gezondheidsrisico's | Milieuschade | Bron |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (Pak's) | Huid- en oogirritatie, braken. | Staar, nier- en leverschade, ademhalingsproblemen, verminderde immunofunctie | Bodemverontreiniging, watervervuiling, ecologische schade | (Patel et al., 2020) |
| Benzothiazolen (BZT's) | Huidirritatie, ademhalingsproblemen. | Verstoring van de hormoonhuishouding, kankerverwekkend en genotoxisch | Bodemverontreiniging, watervervuiling, impact op ecosystemen | (Ginsberg et al., 2011) |
| Isopreen | - | Kankerverwekkend, mutageen, celfwijkingen in de voortplanting | Luchtvervuiling | (Melnick et al., 1994) |
| Zware Metalen (Zink En Lood) | Buikpijn, nierfunctiestoornissen, vermoeidheid, slapeloosheid, artritis, hallucinaties, duizeligheid. | Neurologische schade, geboortefwijkingen, psychose, verlamming, spierzwakte, hersenschade, nierschade, kan zelfs leiden tot de dood | Bodemverontreiniging, watervervuiling, toxiciteit voor flora en fauna | (Jaishankar et al., 2014) |
| Anti-Ozonanten (6PPD-Quinon) | Doodde zalm binnen 5 uur na blootstelling bij $0,8 \pm 0.16 \mu\text{g/l}$ en veroorzaakte leverschade bij muizen. | Gezondheidseffecten op andere zoogdieren zijn nog niet volledig begrepen. | Waterverontreiniging, impact op aquatische ecosystemen. | (Tian et al., 2024) |

2.2 Biologische afbreekbaarheid

Biologische afbraak is een eigenschappen van micro-organismen in de natuur om organische stoffen af te breken. Bacteriën en schimmels spelen hierin een grote rol, deze micro-organismen converteren dood organisch materiaal naar koolstofdioxide en mineralen en spelen hierom een cruciale rol in een hoop processen zoals de koolstof- en mineralen kringloop. Zo scheiden de micro-organismen een groot scala aan enzymen af die biologische afbreekbaarheid mogelijk maken voor een groot aantal verschillende stoffen en producten. Het aantal soorten schimmels en bacteriën is enorm met een geschat aantal schimmels van 1.500.000-5.100.000 en bacteriën van meer dan 1.000.000. In de literatuur worden verschillende micro-organismen genoemd die rubber af zouden kunnen breken. In dit onderzoek is gekozen voor één specifieke bacterie en schimmel stam, de *Nocardia sp.* en de *Aspergillus niger* (Joseph et al., 2022).

2.2.1 *Nocardia sp. DSM 6249*

De *Nocardia*-soorten behoren tot gram-positieve, in de bodem levende bacteriën die organische stoffen afbreken. Hiermee spelen ze een belangrijke rol in de nutriëntencyclus. Sommige stammen van de *Nocardia sp.* kunnen scheiden een speciaal enzym uit genaamd het latex opruimend eiwit (latex clearing protein, of Lcp) (Joseph et al., 2022). Dit enzym is in staat om poly(cis-1,4-isoprene) structuren in natuurrubber af te breken. Dit enzym heeft belangrijke implicaties om op biologische wijze rubberproducten af te breken, waaronder bandenslijpsel. De voorgestelde hydrolyse van poly(cis-1,4-isopreen) door de *Nocardia sp.* leidt tot de vorming van ketonen en aldehyde groepen, zie Figuur 2. Over de werking van Lcp op synthetische rubbers zoals SBR en BR is vooralsnog weinig bekend (Joseph et al., 2022; Röther et al., 2016).



Figuur 2 - Voorgestelde splitsing van poly(cis-1,4-isopreen) door Lcp enzymen van de *Nocardia Sp* (Röther et al., 2016).

2.2.2 *Aspergillus niger DSM 737*

De *Aspergillus niger* is een schimmel die schimmeldraden vormt die bekend staat om zijn cruciale rol in de afbraak van een scala aan organische stoffen. De schimmel groeit in verschillende omgevingen en draagt bij aan de recycling van voedingsstoffen in ecosystemen. De *A. niger* heeft het opmerkelijke vermogen om een groot aantal verschillende enzymen af te scheiden. De schimmel scheidt onder andere laccase, peroxidase, amylase, pectinase, cellulase en lipase enzymen uit. De combinatie van de enzymen zijn in onderzoek aangetoond rubber af te breken. In onderzoek is voorgesteld dat de laccase en peroxidase enzymen een rol kunnen spelen in de afbraak van rubber en bandenslijpsel (Joseph et al., 2022).

De *A. niger* wordt ook veel gebruikt in biotechnologische toepassingen waar de schimmel afvalstoffen kan omzetten in hoogwaardige producten. Het scala aan enzymen kunnen ook

een synergetisch effect uitoefenen in combinatie met een microbieel consortium, zoals via devulkanisatie van rubber. Dit proces maakt rubber makkelijker afbreekbaar voor andere microben door het vulkanisatieproces om te keren (Andler et al., 2021; El-Wafai et al., 2023).

2.2.3 Biologische afbreekbaarheidstest

De international standardisation organisation, of ISO, is een organisatie die standaardprocedures opstelt zodat er door heel Europa proeven uitgevoerd worden op een gestandaardiseerde manier. Dit waarborgt de betrouwbaarheid van resultaten, en maakt het makkelijker voor onderzoekers om resultaten te vergelijken met andere onderzoeken. In 2019 is een Europese norm opgesteld voor het testen van de biologische afbreekbaarheid van plastics, de NEN-ISO14851:2019. Dit onderzoek is gebaseerd op dit protocol en is in samenwerking met onderzoeksinstituut Deltares aangepast om hem toepasbaar te maken voor de biologische afbraak van microrubbers.

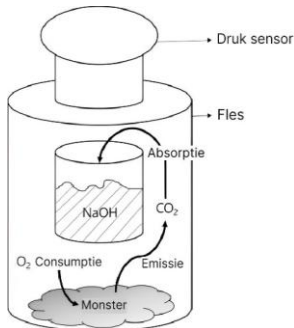
De norm, genaamd de bepaling van de ultieme aerobe-biologische afbraak van kunststofmaterialen in een waterige omgeving - methode met bepaling van zuurstofverbruik in een gesloten respirometer, omschrijft een proefopzet waarin met een gesloten respirometer (zoals de OxiTop®) het biologisch zuurstofverbruik (BZV) bij kan worden gehouden. Door het theoretisch zuurstofverbruik (ThZV) te vergelijken met het gemeten biologisch zuurstofverbruik kan er vervolgens een schatting gemaakt worden van de biologische afbraak die heeft plaatsgevonden gedurende 60 dagen.

De belangrijkste aanpassingen die gemaakt zijn op de norm kwamen door het gebrek aan manometers (OxiTops®). Hierdoor zijn er per experiment één test en één controle uitgevoerd in plaats van de in de norm vermelde triplo. Ook wordt in de norm gesteld dat er actief slib van een waterzuivering gebruikt wordt. Omdat dit onderzoek zich wil richten op specifieke micro-organismen om de afbraak te toetsen is hierom gekozen om de *Aspergillus niger* en de *Nocardia sp.*, en een met bandenslijpsel verontreinigd bodemmonster toe te passen op de methode. Verder is ervoor gekozen om nog twee extra manieren te gebruiken om de afbraak te toetsen. Zo werd er ook gekozen om de betrouwbaarheid van de resultaten te controleren met een duplo van massametingen en GC-analyses.

OxiTops®

De eerste analysemethode is met de OxiTops®. Dit is een meetapparaat dat direct op een fles geschroefd wordt. Het werkt via het principe dat er in een gesloten systeem, bij aerobe afbraak, zuurstof verbruikt wordt door de micro-organismen wat wordt omgezet in CO₂. Door het gevormde CO₂ af te vangen met natronloog pellets wordt er een onderdruk gevormd in de fles wat de OxiTop® vervolgens kan meten, en uit kan drukken als milligram per liter biochemisch zuurstof verbruik (mg/l BZV). Er werden 360 metingen gedaan gedurende zestig en veertig dagen, veertig omdat 6 OxiTops® later vrijkwamen. Op deze manier waren beide metingen op dezelfde dag klaar. Dit geeft een beeld van hoeveel zuurstof er door de micro-organismen is verbruikt om het bandenslijpsel af te breken gedurende het experiment. Figuur 3 geeft een schematische weergave van een OxiTop® fles.

Met opmerkingen [JP5]: plaatje heeft overlap met de tekst



Figuur 3 - Schematische weergave van de OxiTop® fles.

Gas chromatograaf

Een gas chromatograaf (GC) met een Thermal Conductivity Detector (TCD) meet de verandering van de thermische geleidbaarheid van een metaaldradje wanneer de verschillende gassen langs het draadje stromen. Zo meet de GC-concentraties methaan, koolstofdioxide, lachgas, argon, zuurstof en stikstof. De zes resulterende pieken kunnen vervolgens geïntegreerd worden om de concentratie van de gassen in kaart te brengen. Deze waarden kunnen vervolgens vergeleken worden met een opgestelde ijklijn van bekende concentraties. Om de ijklijn voor de zuurstofconcentratie op te stellen werd er gebruik gemaakt van een eenpuntsijklijn met lucht als monster met een bekende concentratie van 20,95% zuurstof. De TCD beschikte over een retentietijd van 22 minuten. De gebruikte kolom was een Agilent J&W GC kolom, Molsieve 5A/Porabond. Aan de hand van de afname van de zuurstofconcentratie na 10 weken kon ook het zuurstofverbruik vastgesteld worden. Ook kan er op deze manier gekeken worden of er andere gassen gevormd werden die de OxiTop® resultaten kunnen beïnvloeden.

Massameting

De derde manier om de afbraak te toetsen was door aan het eind van het experiment de massa-afname van de rubberdeeltjes te meten. Door het rubber aan het begin en aan het einde van het experiment nauwkeurig te wegen, kan de massa-afname nauwkeurig bepaald worden. Het nadeel van deze methode is dat het lastig is om de microdeeltjes uit het glaswerk te spoelen en te scheiden van het medium en de micro-organismen die op en in de deeltjes zijn gegroeid. Hierdoor moesten er verschillende manieren beproefd worden om het bandenslijpsel te reinigen en te filtreren. De foutmarge van dit experiment zal hierom hoger zijn omdat hiervoor geen standaardwerkwijze voor is opgesteld.

Met opmerkingen [JP6]: ga je verderop nog in op deze manieren, dan hier verwijzen naar de paragraaf

3. Materialen en methodes

3.1 Voorbehandeling bandenslijtagedeeltes

De eerste stap voor de biologische afbreekbaarheidstest is het verzamelen van het bandenslijpsel. Het gebruikte bandenslijpsel is afkomstig van Siba Autobanden, Uden waar ze versleten rubberen banden cryogeen gemalen hadden om een deeltjesgrootte van <math><500\mu\text{m}</math> te bereiken. Vijf gram rubber gewassen met 99,9% aceton totdat het aceton helder bleef na spoelen om zo organisch materiaal van het rubberslijpsel te spoelen en te garanderen dat alle rubberdeeltjes uniform werden behandeld. Ook werd tijdens deze stap het bandenslijpsel gefiltreerd op een nylon gaas met een poriegrootte van $80\mu\text{m}$. Dit werd gedaan om de nano-deeltjes uit te scheiden omdat deze te moeilijk waren om terug te wegen en te behandelen. Hierna werden de deeltjes in 70% ethanol gewassen en gedroogd bij 40°C voor 48 uur om het rubber te steriliseren. Hierna werd het rubberslijpsel bewaard in aluminiumfolie.

3.2 Voorbehandeling micro-organismen

Voor de experimenten zijn drie situaties geselecteerd voor degradatie: door een bacterie, door een schimmel, en door micro-organismen afkomstig uit een grondmonster. Elke situatie vereist een eigen opkweek of voorbehandeling.

***Nocardia sp.* DSM 6249**

De geselecteerde bacterie voor het experiment is *Nocardia sp.* DSM 6249, verkregen bij het Leibniz Instituut DSMZ in Duitsland als een levende kolonie. Deze bacterie is opgekweekt in een corynebacterium bouillon (zie bijlage B1.1) gedurende 14 dagen bij 30°C en 100 rpm.

***Aspergillus niger* DSM 737**

Voor de schimmel is gekozen voor *Aspergillus niger* DSM 737, eveneens verkregen bij het Leibniz Institute DSMZ als een levende kolonie. De schimmel is opgekweekt in 250ml aardappeldextrose bouillon van NutriSelect® Basic gedurende 14 dagen bij 30°C en 100 rpm.

Na 14 dagen leken de micro-organismen uitgegroeid en was er naar verwachting geen afbreekbaar organisch materiaal meer aanwezig in het opkweekmedium, zie figuur 4. Vervolgens werden deze in de koeling geplaatst bij 12°C totdat ze enkele dagen later werden gebruikt.



Figuur 4 - De *Nocardia sp.* (links) en *Aspergillus niger* (rechts) na 14 dagen in de broedstovf. De *Nocardia* vormt een biofilm op de bodem van de erlenmeyer en de *Aspergillus* vormt de typische schimmelballen.

Grondmonster van verontreinigde bodem

Het grondmonster werd verzameld langs een snelle bocht, hierdoor zal de grond historisch vervuild zijn met bandenslijpsel, waardoor banden-afbrekende micro-organismen in grote

Met opmerkingen [JP7]: plaatje overlapt met de tekst

getalen aanwezig zouden zijn. Voor het grondmonster werd geen opkweek gedaan, aangezien opkweekmedia de diversiteit van micro-organismen zou beïnvloeden die van nature aanwezig waren in het grondmonster. Voor de extractie van micro-organismen uit de grondmatrix werd een 4 ml 1M natriumpyrofosfaatoplossing toegevoegd aan 4 gram grondmonster. Hierna kon het mengsel heftig geschud worden om de deeltjes in suspensie te krijgen. De suspensie werd vervolgens gecentrifugeerd bij 4000 rpm gedurende 5 minuten. Vervolgens werd het verkregen supernatant opgeslagen in de koeling bij 12°C totdat het enkele dagen later werd gebruikt. Eén milliliter van het supernatant werd toegevoegd aan een LB-bouillon als inoculum test. Na 14 dagen begon aan biofilm te vormen.

3.3 Biologische afbraaktest

Het experiment werd opgedeeld in twee delen, waarbij 10 flessen werden afgesloten met een Viton® rubberen stop zodat deze flessen gebruikt konden worden voor GC-analyses, massa-bepalingen en de eiwit-assay. Daarnaast werden 13 experimenten uitgevoerd met OxiTop® om het BZV te bepalen, wat diende als een maat voor biologische afbraak.

De experimenten werden in drievoud uitgevoerd: twee keer met de afgesloten flessen en één keer met OxiTops®. Aanvankelijk waren 6 OxiTops® beschikbaar, later werden er nog 6 toegevoegd om extra variabelen te testen, zoals een lagere concentratie rubber en een combinatie van schimmel en bacterie. Drie scenario's werden in triplo getest: *Nocardia sp.*, *Aspergillus niger* en micro-organismen uit een grondmonster. Extra scenario's werden toegevoegd bij de beschikbaarheid van meer OxiTops®, waaronder *Nocardia* en *Aspergillus* met een lagere concentratie rubberslijpsel, en een test met zowel schimmel als bacterie om hun wederzijdse invloed te onderzoeken. Alle flessen werden voor gebruik geautoclaveerd en het werk werd zo veel mogelijk steriel uitgevoerd in een laminaire flowkast.

De experimenten verliepen als volgt:

Gesloten flessen met Viton® rubberen stop:

1. Voeg 200 milligram schoon, steriel rubberslijpsel toe aan 100 ml steriel Brunner-medium (zie recept in bijlage B1.1). Het rubberslijpsel fungeert als de enige koolstofbron in het medium.
2. Voeg één milliliter inoculum toe van de respectieve micro-organismen aan elke fles.
3. Voor elk scenario wordt een fles zonder inoculum maar met rubber toegevoegd als controle voor GC-analyses.
4. Voeg ook een fles toe zonder inoculum maar met rubber als negatieve controle om de afbraak te beoordelen zonder inoculum.
5. Sluit de flessen luchtdicht af met een Viton® rubberen stop.
6. Plaats de flessen in klemmen in een schudbroedstoof bij 30°C en 100rpm gedurende 60 dagen.

Flessen met OxiTop®:

1. Voeg 200 milligram schoon, steriel rubberslijpsel toe aan 100 ml steriel Brunner-medium (zie recept in bijlage B1.2). Het rubberslijpsel fungeert als de enige koolstofbron in het medium.
2. Voeg één milliliter inoculum toe van de respectieve micro-organismen aan elke fles.
3. Voor elk scenario wordt een fles zonder inoculum maar met rubber toegevoegd als controle voor GC-analyses en de eiwit-assay.
4. Voeg ook een fles toe zonder inoculum maar met rubber als negatieve controle om de afbraak te beoordelen zonder inoculum.
5. Voeg 10 NaOH pellets (2-3 gram) toe aan het reservoir van de OxiTops® om CO₂ af te vangen.
6. Sluit de fles luchtdicht af door alle doppen strak aan te draaien op de fles.
7. Start BOD₆₀ met de OxiTop® software en verzamel wekelijks BZV-data.

Tabel 3 geeft een weergave van de samenstelling van de verschillende test en controle flessen gebruikt tijdens het experiment. Figuur 5 is een afbeelding van de proefopstelling met alle flessen in de schudbroefstoof.

Tabel 3 - Flessen samenstellingen gebruikt tijdens het experiment voor massabepaling (boven) en BZV (onder).

| Flessen voor massabepaling en GC-analyse | | | | | | |
|------------------------------------------|----------------------------|------------------|-------------|------------|-------------|--------|
| Fles nr. | Bevat | Volume fles (ml) | Medium (ml) | Inent (ml) | Rubber (mg) | Dag en |
| 1 | Nocardia Sp. | 244 | 100 | 1 | 208,4 | 70 |
| 2 | Nocardia Sp. | 244 | 100 | 1 | 201,9 | 70 |
| 3 | Aspergillus Niger | 244 | 100 | 1 | 197,5 | 70 |
| 4 | Aspergillus Niger | 244 | 100 | 1 | 225,6 | 70 |
| 5 | Grondmonster | 244 | 100 | 1 | 211,5 | 70 |
| 6 | Grondmonster | 244 | 100 | 1 | 224,1 | 70 |
| 7 | Controle Nocardia Sp. | 244 | 100 | 1 | - | 70 |
| 8 | Controle Aspergillus Niger | 244 | 100 | 1 | - | 70 |
| 9 | Controle Grondmonster | 244 | 100 | 1 | - | 70 |
| 10 | Negatieve controle | 244 | 100 | 0 | 204,0 | 70 |

| Totaal | |
|-----------------------|-----------|
| Brunner medium | 2300 ml |
| Rubber | 2978,6 mg |

| Legenda | |
|---------------------------|--|
| Nocardia Sp. DSM 6249 | |
| Aspergillus Niger DSM 737 | |
| Grondmonster | |
| Nocardia & Aspergillus | |
| Geen inoculum | |

| OxiTop® flessen voor BZV bepaling | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------|------------|-------------|--------|
| OxiT op* | Bevat | Volume fles (ml) | Medium (ml) | Inent (ml) | Rubber (mg) | Dag en |
| 1 | Nocardia Sp. | 280 | 100 | 1 | 204,6 | 60 |
| 2 | Nocardia Sp. - 100mg | 280 | 100 | 1 | 103,9 | 40 |
| 3 | Aspergillus Niger | 280 | 100 | 1 | 214,7 | 60 |
| 4 | Aspergillus Niger - Duplo | 280 | 100 | 1 | 210,6 | 40 |
| 5 | Aspergillus Niger - 100mg | 280 | 100 | 1 | 125,1 | 40 |
| 6 | Aspergillus & Nocardia Sp. | 280 | 100 | 1 | 223,3 | 40 |
| 7 | Grondmonster | 280 | 100 | 1 | 221,8 | 60 |
| 8 | Nocardia Sp. Controle | 280 | 100 | 1 | - | 60 |
| 9 | Aspergillus Niger Controle | 280 | 100 | 1 | - | 60 |
| 10 | Aspergillus Niger Controle - Duplo | 280 | 100 | 1 | - | 40 |
| 11 | Aspergillus & Nocardia Sp. Ctrl | 280 | 100 | 1 | - | 40 |
| 12 | Grondmonster Controle | 280 | 100 | 1 | - | 60 |
| 13 | Negatieve controle | 280 | 100 | 0 | 201,6 | 60 |



Figuur 5 - Gebruikte proefopstelling; alle test en controle flessen in de schudbroedstoof op 30 graden Celsius en 100 rpm.

3.4 Terugwinning van rubberdeeltjes

Na 60 dagen incubatietijd werden de rubber deeltjes uit de fles gespoeld met demiwater en vervolgens gereinigd met 70% ethanol. Hierna werd het medium op 1 M NaOH gebracht met 4 gram NaOH pellets en werd het monster 10 minuten gekookt om de biomassa van de rubberdeeltjes te verwijderen. Hierna werd met een 10,15 M HCl oplossing het medium op \sim pH 7 gebracht zodat dit gefiltreerd kon worden op een 8,0 μ m membraam filter (Millipore 8,0 μ m MCE-membraam, 47mm) zonder het filter te beschadigen, ook werd het rubber vervolgens meerdere keren gespoeld met demiwater en ethanol om de gevormde zouten af te spoelen. Enkele controles werden op dezelfde manier uitgevoerd om te bepalen hoeveel massa verlies er op trad gedurende het filtratie proces, zie bijlage B2.1, controle massabepaling.

3.5 Massa-afname bepalen

Na 60 dagen incubatietijd werden de flessen vacuüm gefiltreerd op een cellulose vezel membraam filter met een poriëgrootte van 8.0 μ m, van Millipore. Het rubber werd vervolgens gespoeld met demiwater en 70% ethanol. Van tevoren werden er controles uitgevoerd om de massa-afname van de filtratiestap te bepalen gezien er vaak rubber bleef plakken aan de trechter van de filtratieopstelling, zie bijlage B2.1, controle massabepaling. De massa-afname die plaats vond tijdens het terugwinnen van het rubber bij de controles was $1,96 \pm 1,75$ mg. Ook is er op verschillende wijzen geprobeerd de gevormde biomassa in de flessen op te lossen om alleen het rubberslijpsel te wegen. Echter leek dit niet te lukken met 1M natronloog (NaOH), 15% waterstofperoxide (H₂O₂) of aceton, of werd het bandenslijpsel beschadigd. De test met NaOH bleek het meest effectief in het verwijderen van de bacteriële biomassa, hierom is ervoor gekozen deze methode toe te passen op de test flessen.

De massa van de rubberdeeltjes werden voor en na de incubatietijd bepaald met een nauwkeurige balans, de Mettler AT400 (0,1 mg nauwkeurig). Om de massa zo nauwkeurig mogelijk te bepalen werd het bandenslijpsel gewogen op het filter in een aluminium weegbakje na 3 uur drogen op 90 °C in een droogstoof. Hiervoor moest eerst de massa van

de filters bepaald worden. Vergelijking 1 geeft de gebruikte vergelijking weer voor de bepaling van de massa-afname.

Vergelijking 1 - Voor de bepaling van gewichtsverlies (in %)

$$\% \text{ gewichtsverlies} = \frac{(m_b + m_f - m_e)}{m_b + m_f} * 100$$

Waar m_b de beginmassa van het rubberslijpsel is, m_f de massa van het gebruikte filter en m_e de massa van het teruggewonnen rubberslijpsel met filter na drogen in de droogstoof.

3.6 Afbraak berekenen met biologisch zuurstofverbruik (BZV)

Voor de bepaling van de biologische afbraak aan de hand van BZV moet er eerst een beeld komen van het theoretische zuurstofverbruik (ThZV), het zuurstofverbruik dat verwacht wordt bij de volledige oxidatie van één gram van het bandslijpsel. In eerder onderzoek werd het ThZV van het bandslijpsel geschat op basis van het chemische zuurstofverbruik volgens standaardmethoden met $K_2Cr_2O_7$ als oxidatiemiddel. Het theoretisch zuurstofverbruik werd in dit onderzoek bepaald op 1.67 g O_2 /g bandslijpsel (Nielsen et al., 2023).

De OxiTop® neemt zes tot acht metingen per dag, om deze data te benutten moet het specifieke zuurstofverbruik (BZV_s) berekend worden. Dit werd getest door de test flessen met de controle test (flessen zonder toegevoegd rubber) te vergelijken met de concentratie van het rubberslijpsel. Naar verwachtingen bleven de BZV-waardes stijgen tot ze het plateau bereiken, wanneer de BZV-waarde afnam, werden de flessen gecontroleerd op luchtdichtheid, en werd de hoogste BZV-waarde gebruikt aan het eind van het experiment, zie vergelijking 2.

Vergelijking 2 - Voor de bepaling van de specifieke BZV van de OxiTop® flessen

$$BZV_s = \frac{BZV_t - BZV_{ct}}{\rho_{TC}}$$

Waarbij:

BZV_s : de specifieke BZV, gemeten in milligram per gram testmateriaal.

BZV_t : de BZV van de flessen die testmateriaal bevatten op een specifiek tijdstip t , gemeten in milligram per liter.

BZV_{ct} : de BZV van de controle tests op tijd t , ook gemeten in milligram per liter.

ρ_{TC} : de concentratie van het testmateriaal in het reactiemengsel, gemeten in gram per liter.

Vervolgens kon het percentage biologische afbraak, D_t , berekend worden aan de hand van het theoretische en specifieke zuurstofverbruik. (ThZV is uitgedrukt in milligram O_2 per gram testmateriaal, = 1670mg O_2 /g bandslijpsel). Zie vergelijking 3.

Vergelijking 3 - Voor de bepaling van de massa-afname (in %) op basis van het BZV

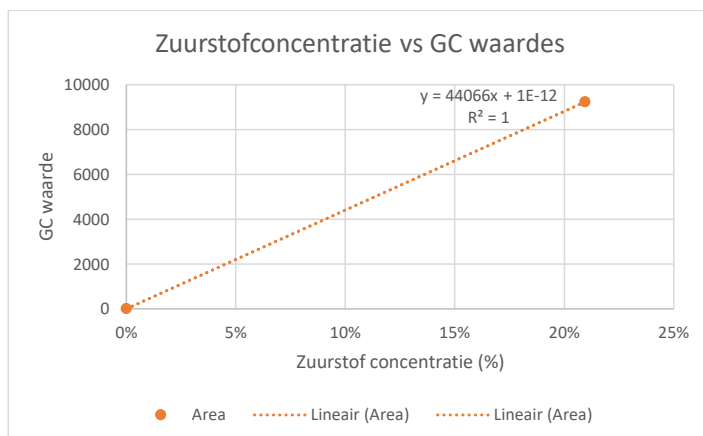
$$D_t = \frac{BZV_s}{ThZV} * 100$$

Met deze berekeningen kan er beredeneerd worden hoeveel bandenrubber er afgebroken wordt over tijd. De BZV-data werden verzameld gedurende 40 en 60 dagen.

3.7 Gas chromatograaf-analyses

Voor het experiment werd een gas chromatograaf (GC) gebruikt om de zuurstofconcentratie na afloop van het experiment te meten in de fles. Door de zuurstofconcentratie aan het begin van het experiment te vergelijken met de concentratie aan het eind, kan je een beeld krijgen over de zuurstofconsumptie die er plaats heeft gevonden. Deze methode is een minder accurate manier om het zuurstofverbruik te meten, maar werd gebruikt als extra meet methode om vast te stellen of de OxiTop® accurate data leverde vanwege het gebrek aan materiaal.

Zoals in het theoretisch kader vermeld werd dit getest met een Thermal Conductivity Detector (TCD) met een retentietijd van 22 minuten. De gebruikte column was een Agilent J&W GC column, Molsieve 5A/Porabond. De gasmetingen werden uitgevoerd na 10 weken. Om de zuurstofconcentratie te bepalen in de fles werd er gebruik gemaakt van een éénpuntsijklijn. Door een 0,5 ml luchtmonster in de GC te spuiten kon er een waarde verkregen worden voor de zuurstofconcentratie van 20,95%, de zuurstofconcentratie in de lucht. De waarde werd vastgesteld op 9231,7. Hiermee kon vervolgens een ijklijn worden opgesteld van $y = 44066x$. Aan de hand van de ijklijn kan dan het zuurstofverbruik berekend worden, zie figuur 6.



Figuur 6 - Éénpuntsijklijn voor zuurstofconcentratie bepaling

4. Resultaten

In dit hoofdstuk worden alle resultaten weergegeven van de verschillende experimenten. Zoals in de methodes omschreven zijn er drie typen data verzameld: BZV met de OxiTops®, gas chromatograaf-analyses en massabepaling.

4.1 Biologisch zuurstofverbruik

Zoals omschreven in het methodes hoofdstuk zijn er voor het biologisch zuurstofverbruik twee datasets om de afbraak van bandenslijtagedeeltjes in kaart te brengen: de test flessen en de controlegroepen. In dit hoofdstuk worden de resultaten van de verschillende experimenten weergegeven.

De controles dienen als test om het biologisch zuurstofverbruik te meten wat niet gelinkt is aan de afbraak van het rubberslijpsel. Bij dit type microbiologisch onderzoek is het belangrijk om controle flessen op te stellen om te kunnen zien wat het verschil in microbiële activiteit is in de flessen waar het rubberslijpsel is toegevoegd en daar waar alleen het Brunner medium aanwezig is naast het ent materiaal.

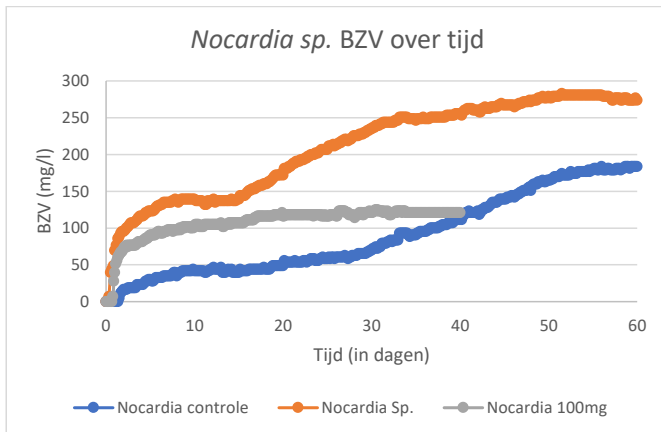
In de controle test is er ook een negatieve controle uitgevoerd. Dit is een experiment waar geen rubber en geen entmateriaal is toegevoegd aan het Brunner medium. Wel vindt hier nog gemeten zuurstofverbruik plaats. Het waargenomen zuurstofverbruik is gelinkt aan gassenutwisseling tussen de lucht in het monster en het Brunner medium. Hierom neemt de druk in de fles af en wordt dit waargenomen als BZV. In de NEN-EN ISO:14851 is gesteld dat de negatieve controle betrouwbaar is als deze onder de 60mg/l blijft. Tijdens dit experiment was de maximale waarde van het BZV 41,8 mg/l.

4.1.1 *Nocardia sp.*

In het controle-experiment vertoonde *Nocardia sp.* opvallend hoge BZV-waarden, die na twintig dagen significant hoger uitvielen dan die van de andere controles. De langzame stijging van de BZV-waarden in de eerste twintig dagen maakt het onwaarschijnlijk dat resterend organisch materiaal uit het opkweekmedium de oorzaak was. Een plausibele verklaring voor de latere stijging is het afsterven van bacteriën in de controlefles, waardoor vrijgekomen organisch materiaal door andere bacteriën kon worden afgebroken, resulterend in een verhoogde BZV. Dit verschijnsel verklaart ook het bereiken van een plateau in BZV-waarden na zestig dagen, een fenomeen dat bij de andere controles eerder optrad.

De testfles met *Nocardia sp.* registreerde na zestig dagen een BZV van 274 mg/l en bereikte een plateau, waarbij de BZV-waarden in de laatste dertien dagen met minder dan 10 mg/l varieerden. Dit wijst erop dat de maximale biologische afbraak rond dag 47 had plaatsgevonden.

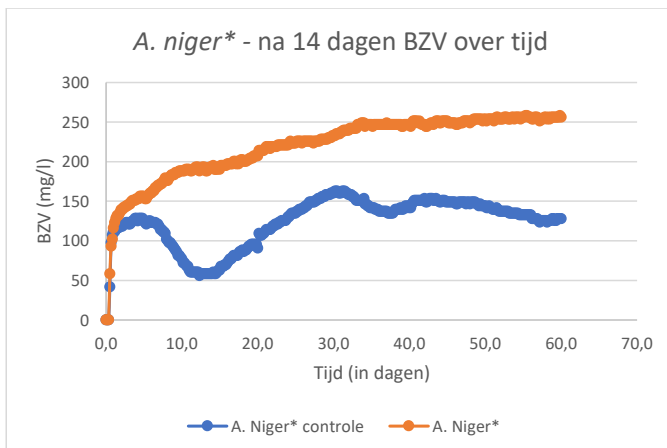
Bij een test met een lagere rubberconcentratie, 100 milligram per 100 ml (de helft van het originele experiment), was de BZV na veertig dagen 121 mg/l, bijna de helft van de 255 mg/l die na veertig dagen in het originele experiment werd gemeten. Deze bevindingen, in lijn met de verwachtingen, worden geïllustreerd in figuur 7 en benadrukken de afhankelijkheid van BZV-waarden van de rubberconcentratie.



Figuur 7 - Nocardia sp. BZV-waardes van de controle en test fles over tijd.

4.1.2 Aspergillus niger - na 14 dagen

Een opvallende bevinding is dat *Aspergillus niger* in de controles sneller steeg dan de rest. Zo bereikte de controle al een BZV van boven de 120mg/l na twee dagen. Er waren ook schommelingen te zien, mogelijk door een niet volledig afgesloten fles of door andere gassen die werden gevormd door de schimmel die niet werden afgevangen door het natronloog. Een mogelijke reden voor deze snelle stijging is dat het organische materiaal in het entmateriaal na 14 dagen nog niet volledig was verbruikt. Daarom is besloten de controle en de test met *Aspergillus niger* te herhalen. De eerste resultaten zijn met een asterisk (*) gemarkeerd om aan te geven dat ze waarschijnlijk niet betrouwbaar zijn, zoals te zien in figuur 8.

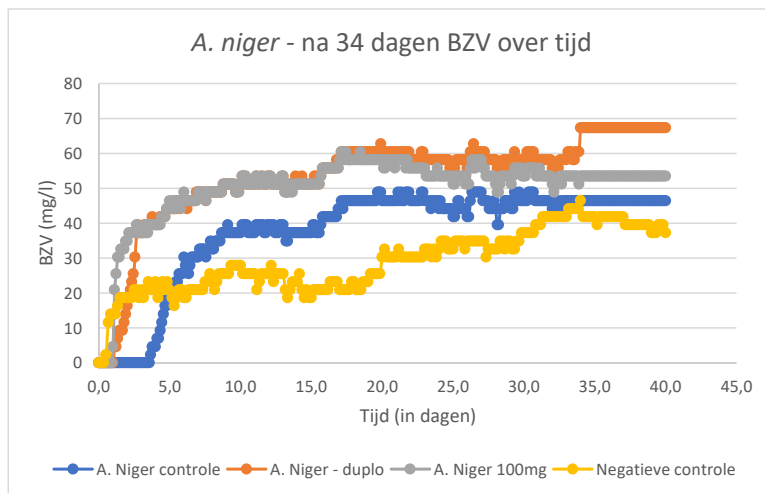


Figuur 8 - A. Niger na 14 dagen BZV-waardes van de controle en test fles over tijd. *waarschijnlijk onbetrouwbare resultaten

4.1.3 *Aspergillus niger* - na 34 dagen

Het experiment met de *Aspergillus niger* was na 34 dagen opkweek opnieuw uitgevoerd. Hier is te zien dat de controle de trend van de negatieve controle bijblijft. Dit wijst erop dat de schimmel niet nog doorgroeit op de bouillon nadat deze was ingebracht in het Brunner medium. Toch blijft het zuurstofverbruik net boven die van de negatieve controle, zie figuur 9, wat suggereert dat er nog wel microbiële activiteit plaatsvindt en de schimmel levend in de fles is geënt. Om deze reden lijkt deze tweede test meer betrouwbaar te zijn.

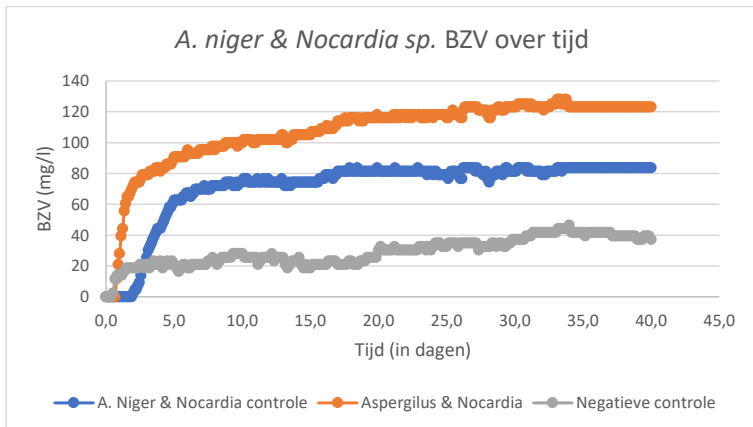
De *Aspergillus niger* toonde echter een laag BZV. De test met 200mg rubber bereikte een BZV van 67,3mg/l na 34 dagen. Het experiment met 100mg rubber bereikte een BZV van 53,4mg/l na 32 dagen. De waarden van zowel de controle als test flessen behaalde weer hun maximum. Dit geeft aan dat er geen microbiële activiteit plaats vond in de fles na 33 dagen. Een verklaring voor de lage BZV-waarden is dat de *Aspergillus niger* weinig tot geen rubber af kan breken.



Figuur 9 - *A. Niger* na 34 dagen BZV-waarden van de controle en test fles over tijd.

4.1.4 *Aspergillus niger* & *Nocardia sp.* - na 34 dagen

In dit onderzoek vertoonde *Aspergillus niger* weinig tot geen afbraak. Om te bepalen of *Aspergillus niger* de afbraak door andere micro-organismen kon bevorderen, werd deze gecombineerd met *Nocardia sp.* De BZV in het controle-experiment piekte op 83,6 mg/l na 26 dagen, terwijl de fles met rubber een vergelijkbare piek van 123 mg/l na 26 dagen liet zien. Het is dus te zien dat er een kleine interactie is tussen de micro-organismen en het rubber. Echter lijkt deze niet zo sterk te zijn als de micro-organismen op zich. Volgens literatuuronderzoek heeft de gebruikte stam van *Aspergillus niger* een sterk antimicrobieel effect. Dit verklaart waarom de BZV lager liggen dan die van het experiment met de *Nocardia sp.* Net als in het experiment met enkel *Aspergillus*, is het ook in deze combinatie moeilijk vast te stellen of het verhoogde zuurstofverbruik daadwerkelijk wijst op afbraak van rubber.

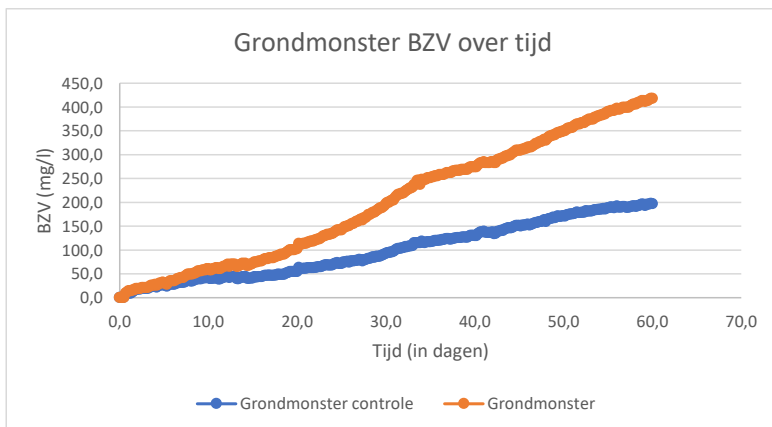


Figuur 10 - Combinatie *A. niger* & *Nocardia* sp. BZV-waardes van de controle en test fles over tijd.

4.1.5 Grondmonster

Het zuurstofverbruik in het controle-experiment met het grondmonster was na zestig dagen hoger dan bij de andere controles, waarschijnlijk door een kleine hoeveelheid organisch materiaal die tijdens het enten nog aanwezig was in het entmateriaal. Deze reactie was minder extreem dan bij het eerste controle-experiment met *A. niger*, waardoor deze resultaten als betrouwbaar worden beschouwd, mede omdat de testfles een vergelijkbare stijging liet zien als de controle. Het controle-experiment bereikte een zuurstofverbruik van 200 mg/l na 60 dagen, wat aangeeft dat het organische materiaal in de controle nog niet volledig was verbruikt. Om deze reden is ervoor gekozen het experiment voor langere tijd in te zetten, echter paste dit niet in de afstudeerperiode.

De testfles met het grondmonster toonde aan het einde van het experiment de hoogste BZV-waarde, met een BZV van 418 mg/l na 60 dagen, en de waarde was nog steeds stijgende. Dit duidt erop dat er nog afbreekbaar materiaal in de testfles aanwezig was, zoals geïllustreerd in figuur 11.



Figuur 11 - Grondmonster BZV waardes van de controle en test fles over tijd.

4.1.6 Berekende afbraak (% ThZV)

Zoals omschreven in het methodes hoofdstuk kan aan de hand van vergelijking 2 en 3 de biologische afbraak van het bandenslijpsel berekend worden. Door het specifieke zuurstofverbruik te vergelijken met het theoretisch nodig zuurstofverbruik. Figuur 12 geeft de grafieken weer van alle experimenten.

Belangrijk om te benoemen is dat de waarden voor % afbraak fluctueren. De % afbraak neemt af wanneer de BZV-waarden van de controles test sneller stijgen dan die van de test flessen, zie vergelijking 2. Hierom is het belangrijk om de resultaten van zowel de controles als de test flessen grondig te analyseren.

Grondmonster

De test met de hoogst berekende afbraak is die van het grondmonster. Na zestig dagen had het grondmonster een theoretische afbraak bereikt van 6,63%. Dit komt omdat het zuurstofverbruik van de test fles gedurende het gehele experiment sneller bleef stijgen dan die van de controle test. Dit betekent dat het bandenslijpsel benut kan worden als koolstofbron voor het mengsel aan micro-organismen in het monster. De stijgende lijn duidt aan dat het experiment nog niet af is gelopen en dat de totale afbraak hoger kan liggen dan de in dit onderzoek aangetoonde 6,63%. Dit geeft weer hoe de diversiteit aan micro-organismen meer verschillende enzymen uitscheiden welke elkaar versterken en zo het bandenslijpsel meer volledig af kunnen breken.

Nocardia sp.

De *Nocardia sp.* moet anders berekend worden. Gezien de controle naar verwachting bleef stijgen door het afsterven van de micro-organismen in de fles, is er gekozen om het hoogste punt in de grafiek te gebruiken als totale afbraak. Vervolgens kan dit vergeleken worden met de GC-analyses en massametingen om de betrouwbaarheid van dit resultaat te garanderen.

De resultaten van zowel de test met 200 milligram als die met 100 milligram komen dicht in de buurt en kunnen samen gebruikt worden. De test met 200 milligram behaalt zijn piek op 5,00% afbraak, de test met 100 milligram behaalt zijn piek op 4,31%. Dit duidt aan dat het Lcp enzym een effect heeft op een deel van het bandenslijpsel, maar dat het geen of weinig effect heeft op het merendeel van de stoffen.

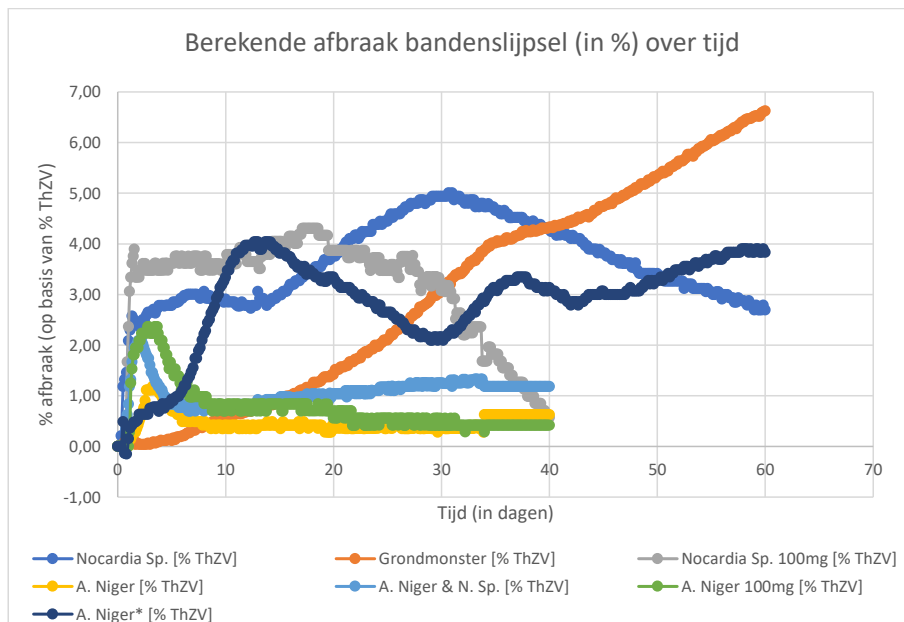
***Aspergillus niger* (en varianten)**

De eerste test van de *Aspergillus* is gemarkeerd met een sterretje (*) vanwege de waarschijnlijke onbetrouwbaarheid van deze resultaten. De resultaten van de *A. niger* zijn opmerkelijk. In het begin van de grafiek is een grote piek te zien. Dit komt omdat de controle experimenten van de *Aspergillus* en *Aspergillus* & *Nocardia* samengevoegd pas na ongeveer vijf dagen beginnen te klimmen terwijl de test flessen als snel boven de nul uitschieten. Om deze reden wordt de piek niet beschouwt als het eindresultaat. Na tien dagen zijn de drie tests en controles in evenwicht en vind er nog weinig verandering plaats in de berekende afbraak. Na tweeëndertig dagen hebben alle drie de experimenten een plateaufase bereikt.

De *A. niger* 200mg geeft een berekende afbraak van 0,63%, die van 100mg geeft 0,42%, en de combinatie van *Aspergillus* en *Nocardia* geeft een afbraak van 1,18%. Deze resultaten duiden erop dat de *Aspergillus niger* niet effectief is in de afbraak van bandenslijpsel.

Gezien de BZV-waardes nauwelijks hoger zijn dan die van de negatieve controle, kan er gesteld worden dat er geen afbraak van het rubber heeft plaatsgevonden en dat het extra zuurstofverbruik verklaart kan worden door respiratie van de schimmel wat na een aantal dagen stopte. Dit duidt aan dat de complexe combinatie aan enzymen die de schimmel uit scheidt, weinig waarneembaar effect heeft op het bandenslijpsel.

Eén opmerkelijk resultaat is die van de combinatie van bacterie en schimmel. In onderzoek van (Guo et al., 2020) werd gesteld dat de *Aspergillus niger* beschikt over een sterk antibacterieel effect. Dit is terug te zien in het resultaat gezien de combinatie van deze bacterie en schimmel bijna exact dezelfde lijnen volgt als die van alleen de schimmel. Toch is er te zien dat er meer iets meer zuurstof is verbruikt tijdens dit experiment dan bij de andere twee. Waarschijnlijk komt dit niet door een hogere afbraak van het bandenslijpsel, maar door de interactie tussen de *Nocardia sp.* en de *Aspergillus niger*.



Figuur 12 - Grafiek met berekende biologische afbraak van bandenslijpsel van de 7 geteste scenario's. *De eerste test met de *Aspergillus niger* is onbetrouwbaar.

4.2 Massa-afname

Om de vraag te beantwoorden over de afbreekbaarheid van bandenslijtagedeeltjes, zijn er ook flessen ingezet voor de bepaling van massa-afname. In hoofdstuk 3 methodes staat omschreven hoe dit is ingezet. Na het koken van de rubberdeeltjes in 1M natronloog werden deze gefiltreerd en nauwkeurig gewogen. De resulteren massametingen worden weergegeven in tabel 4. In bijlage B1 is het proces van de terugwinning van het bandenslijpsel omschreven. Er is aangetoond dat er bij de terugwinning massaverlies optrad. Hierom is de standaardafwijking opgesteld van de resultaten, deze is toegepast in tabel 4, zo trad er gemiddeld $1,96 \pm 1,75$ mg massa verlies op, waarmee de afbraak (in %) een standaardafwijking van gemiddeld $\pm 0,84\%$ heeft.

Tabel 4 - Resultaten van de massametingen met gemiddeld massaverlies met standaardafwijking van $1,96 \pm 1,75\text{mg}$ van de controle massabepaling, zie tabel B1 in de bijlage.

| Fles nr. | Bevat | Massa begin (mg) | Massa filter (mg) | Massa na wegen (mg) | Massa eind (mg) | Verschil (mg) | Verschil met afwijking (mg) $\pm 1,75\text{mg}$ | Verschil met afwijking (%) $\pm 0,84\%$ |
|----------|--------------------------|------------------|-------------------|---------------------|-----------------|---------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | <i>Nocardia sp.</i> | 208,4 | 1809,5 | 2007,9 | 198,4 | 10,0 | 8,0 | 3,86% |
| 2 | <i>Nocardia sp.</i> | 201,9 | 1796,5 | 1989,9 | 193,4 | 8,5 | 6,5 | 3,24% |
| 3 | <i>Aspergillus niger</i> | 197,5 | 1852,5 | 2058,4 | 205,9 | -8,4 | -10,4 | -5,25% |
| 4 | <i>Aspergillus niger</i> | 225,6 | 1847,2 | 2091,1 | 243,9 | -18,3 | -20,3 | -8,98% |
| 5 | Grondmonster | 211,5 | 1858,5 | 2075,3 | 216,8 | -5,3 | -7,3 | -3,43% |
| 6 | Grondmonster | 224,1 | 1805,3 | 2033,7 | 228,4 | -4,3 | -6,3 | -2,79% |
| 7 | Negatieve controle | 204,0 | 1806,5 | 2010,2 | 203,7 | 0,3 | -1,7 | -0,81% |

Nocardia sp.

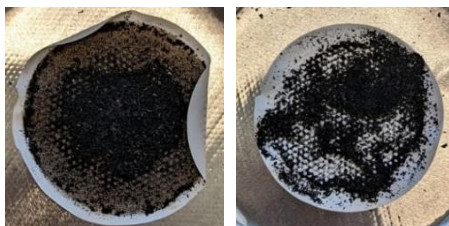
De *Nocardia sp.* loste goed op in het natronloog, dit is terug te zien in de resultaten. De afbraak van de *Nocardia sp.* is gemiddeld $3,55 \pm 0,84\%$ afhankelijk van hoe nauwkeurig de terugwinning van het bandenslijpsel is uitgevoerd.

Aspergillus niger

Zoals in bijlage B2.2 vermeld, was het niet mogelijk de *Aspergillus niger* op te lossen in natronloog, ook is er veel biomassa gegroeid omdat er veel organisch materiaal in het entmateriaal zat dat is gebruikt, dit werd duidelijk in de resultaten van de OxiTops®, zie hoofdstuk 4.1.1. De combinatie hiervan leidt ertoe dat er een toename is in de gewogen massa na de duur van het experiment. Hierdoor kan gesteld worden dat de massameting van de *Aspergillus niger*, niet representatief is van de afbraak die heeft plaatsgevonden en dit resultaat onbetrouwbaar is.

Grondmonster

In bijlage B2.2 was de verwachting dat het koken in natronloog de biomassa van het grondmonster goed op zou lossen. Echter werd tijdens het uitvoeren van de filtratie duidelijk dat de massameting niet betrouwbaar zouden zijn. Zo bleef er een bruinkleurig residu achter op het filter, waarschijnlijk als gevolg van gegroeide biomassa of zand, zie figuur 13. De massa-afname van het bandenslijpsel kan dus niet op deze manier gemeten worden met het gebruikte entmateriaal.



Figuur 13 - Filter met verontreiniging van het grondmonster (links) vergeleken met die van *Nocardia sp.* (rechts)

Met opmerkingen [JP8]: plaatje overlapt met de tekst

4.3 Gas chromatograaf

Voordat de flessen uit elkaar werden gehaald voor de massabepalingen, werd de zuurstofconcentratie in de fles bepaald met een gas chromatograaf. Hiervoor werd eerst de zuurstofconcentratie in de fles berekend, omgezet naar milligram zuurstof, wat vervolgens vergeleken kon worden met het zuurstofgehalte in het luchtmonster. Tabel 5 geeft de resultaten van de GC-analyses op de test flessen weer.

Net als in de andere experimenten is het resultaat van de *Aspergillus niger* in twijfel getrokken. Het ent materiaal dat in de dichte flessen zijn gebruikt is hetzelfde ent materiaal als bij de OxiTop® flessen. In figuur 8 is te zien dat het ent materiaal beschikt over te veel afbreekbaar organisch materiaal. Hierom zijn ook hier de resultaten onbetrouwbaar.

Tabel 5 - Resultaten GC-analyse test flessen met O2 verbruikt

| Monster | Gebied | Concentratie (%) | Gehalte (mg) | O2 verbruikt (mg) |
|--------------------------|---------|------------------|--------------|-------------------|
| <i>Nocardia sp.</i> | 6409,88 | 14,55% | 31,52 | 13,88 |
| <i>Nocardia sp.</i> | 6014,26 | 13,65% | 29,58 | 15,82 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 5694,62 | 12,92% | 28,01 | 17,40 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 5786,42 | 13,13% | 28,46 | 16,94 |
| Grondmonster | 5755,92 | 13,06% | 28,31 | 17,09 |
| Grondmonster | 6065,51 | 13,76% | 29,83 | 15,57 |
| Lucht | 9231,75 | 20,95% | 45,40 | n/a |

Deze data konden vervolgens vergeleken worden met de data van de controle flessen, zie tabel 6.

Tabel 6 - Resultaten GC-analyse controle flessen met O2 verbruikt

| Monster | Gebied | Concentratie (% O2) | Gehalte (mg) | O2 verbruikt (mg) |
|--------------------------|------------|---------------------|--------------|-------------------|
| <i>Nocardia sp.</i> | 8196,79... | 18,60% | 40,31 | 5,09 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 7116,29... | 16,15% | 35,00 | 10,40 |
| Grondmonster | 8352,26... | 18,95% | 41,08 | 4,33 |
| Controle | 8917,63... | 20,24% | 43,86 | 1,54 |
| Lucht | 9231,75... | 20,95% | 45,40 | n/a |

Vervolgens kon vergelijking 3 opnieuw toegepast worden om de % afbraak te berekenen aan de hand van het theoretisch zuurstofverbruik (ThZV), zie tabel 7.

Tabel 7 - Resultaten van de GC-analyses met berekend % afbraak van het bandenslijpsel

| Nr. | Monster | O2 verbruikt (mg) | % afbraak (% ThZV) | Gemiddelde afbraak (% ThZV) |
|-----|--------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| 1 | <i>Nocardia sp.</i> | 8,79 | 2,63% | 2,92% |
| 2 | <i>Nocardia sp.</i> | 10,73 | 3,21% | |
| 3 | <i>Aspergillus niger</i> | 6,99 | 2,09% | 2,03% |
| 4 | <i>Aspergillus niger</i> | 6,54 | 1,96% | |
| 5 | Grondmonster | 12,77 | 3,82% | 3,60% |
| 6 | Grondmonster | 11,25 | 3,37% | |
| 7 | Controle | 1,54 | - | 0,46% |

Aan de hand van de resultaten in tabel 7 kan gesteld worden dat er in de flessen met het grondmonster als entmateriaal, de meeste afbraak van bandenslijpsel heeft plaatsgevonden. Uit de resultaten van de gas chromatograaf kan geleid worden dat het experiment met het grondmonster het meeste rubber afbreekt.

4.4 Vergelijken

Alle drie de gebruikte methodes lijken verschillende data te geven en verschillende betrouwbaarheid te hebben. Toch is er een patroon te herkennen aan de verzamelde data. Tabel 8 geeft een overzicht van de berekende of gewogen massa-afnames van de drie verschillende methodes.

Tabel 8 - Alle (betrouwbare) resultaten van de verschillende meet methoden uitgedrukt in % afbraak. *n/a, onbetrouwbare resultaten door contaminatie van het Brunner medium of rubberslijpsel.

| Test fles | Rubber (mg) | OxiTops® (%) | GC -analyse (%) | Massa bepaling (%) |
|--------------------------------|-------------|--------------|-----------------|--------------------|
| <i>Nocardia sp.</i> | 200 | 5,00% | 2,92% | 3,55 ± 0,84% |
| <i>Nocardia sp.</i> | 100 | 4,31% | - | - |
| <i>Aspergillus niger</i> | 200 | 0,63% | n/a* | n/a* |
| <i>Aspergillus niger</i> | 100 | 0,42% | - | - |
| <i>A. niger & Nocardia</i> | 200 | 1,18% | - | - |
| Grondmonster | 200 | 6,70% | 3,60% | n/a* |

In de tabel is te zien dat alle waardes die naar verwachting goed verlopen zijn, bij elkaar in de buurt liggen. Zo ligt de massameting van de *Nocardia sp.* dichtbij de berekende afbraak van het BZV. Ook is te zien aan de GC-analyse dat het grondmonster meer zuurstof heeft verbruikt dan de *Nocardia sp.* wat weer in lijn is met de data van de OxiTops®. Zo kan er dus met de verzamelde data gesteld worden dat massa-afname relatief nauwkeurig berekend kan worden aan de hand van de BZV-waardes van de OxiTops® en dat dit de meest betrouwbare methode is om biologische afbraak van microplastics te toetsen.

5. Conclusie

Bandenslijpsel is de grootste bron van microplastics in het Nederlandse milieu. Jaarlijks komt er een geschatte 10.000 ton microplastics terecht in de bodem, het water en de lucht. Diverse additieven die uitlogen uit bandenslijpsel, zijn aangetoond een toxisch effect te hebben op zoogdieren en het milieu. Hoewel er over de toxiciteit van bandenslijpsel op mensen nog weinig bekend is, vormt bandenslijpsel een belangrijke bron van fijnstof, wat leidt tot een afnemende luchtkwaliteit, vooral in stedelijke gebieden, wat schadelijk is voor de mens.

Vanwege de gevolgen voor de volksgezondheid van bandenslijpsel is in dit onderzoek gezocht naar een antwoord op de vraag: 'Is het mogelijk bacteriën, schimmels en bodemmicrobiële gemeenschappen te gebruiken om bandenslijpsel af te breken onder ideale omstandigheden in een laboratorium gedurende zestig dagen?' Hiervoor is een kwantitatief onderzoek uitgevoerd om de biologische afbraak van bandenslijpsel te onderzoeken met twee verschillende micro-organismen en een bodemmicrobiële gemeenschap: *Nocardia sp.*, *Aspergillus niger* en een grondmonster van sterk verontreinigde bodem.

Uit de resultaten is af te leiden dat biologische afbraak van bandenslijpsel wel degelijk mogelijk is. Zowel het grondmonster als de *Nocardia sp.* laten zien dat de toevoeging van een microbiële gemeenschap leidt tot significante afbraak vergeleken met de negatieve controle na onderzoek met de OxiTops®, de gaschromatograaf en door de massa-afname te bepalen. De aangetoonde afbraak door de *Nocardia sp.* lag, na de drie analysemethoden toegepast te hebben, tussen de 2,92% en 5,00%. Het grondmonster kon niet nauwkeurig worden gemeten om de massa-afname te bepalen, maar data van de GC en OxiTops® gaven afbraak aan tussen de 3,60% en 6,70% na zestig dagen.

De *Aspergillus niger* en varianten op dit experiment (200 mg rubber, 100 mg rubber en met de *Nocardia sp.* en 200 mg rubber) lieten minder afbraak zien. Zo was de BZV-data van alle drie de experimenten na veertig dagen bijna identiek aan die van de negatieve controle. Als we dezelfde berekeningen toepassen als bij de *Nocardia* en het grondmonster, suggereert de BZV dat er tussen de 0,42% en 0,63% afbraak heeft plaatsgevonden (berekend uit OxiTop-data van de flessen met 100 mg en 200 mg rubber respectievelijk). Uit dit onderzoek is ook gebleken dat de gevormde biomassa van de schimmel slecht tot niet op te lossen is zonder het bandenslijpsel aan te tasten. In de combinatie van *Aspergillus niger* en *Nocardia sp.* was te zien dat de *Aspergillus niger* de *Nocardia sp.* doodde, wat als gevolg had dat het berekende afbraakpercentage onder 1,18% bleef.

De resultaten onderbouwen de hypothese dat slechts een klein aandeel van het bandenslijpsel wordt afgebroken. Uit dit kwantitatieve onderzoek is gebleken dat er wel degelijk componenten in het bandenslijpsel zitten die biologische afbraak mogelijk maken. Ook is uit dit onderzoek gebleken dat een complexe microbiële gemeenschap een groter aandeel van het bandenslijpsel afbreekt na zestig dagen in vergelijking met de geteste individuele stammen.

6. Discussie

Voor dit onderzoek is elk experiment conform de NEN-EN ISO14851:2019 norm driemaal uitgevoerd. Wegens een tekort aan materiaal is echter besloten om per experiment slechts één fles met het OxiTop® systeem af te sluiten. De overige twee flessen werden geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf en door de massa-afname te meten. Deze aanpak garandeert dat bij herhaling van het experiment onder dezelfde omstandigheden, de resultaten betrouwbaar en herhaalbaar zijn, en dus valide.

Volgens de ISO-norm dienen ook de nulmetingen driemaal te worden uitgevoerd. Door een gebrek aan materialen is echter gekozen om de nulmetingen slechts tweemaal uit te voeren: eenmaal met de OxiTop® en eenmaal voor GC-analyse. De resultaten van deze nulmetingen voldeden aan de verwachtingen, behalve bij *Aspergillus niger*, waarbij de eerste nulmeting onverwachte resultaten opleverde. Deze nulmeting en het daaropvolgende experiment zijn later herhaald, waarbij de resultaten beter in lijn lagen met de overige metingen, wat de betrouwbaarheid verhoogt.

De initiële onverwachte resultaten bij *Aspergillus niger* kunnen waarschijnlijk worden toegeschreven aan een overschot aan afbreekbaar organisch materiaal in het entmateriaal. Bij de herhaalde test, waarbij hetzelfde entmateriaal werd gebruikt, had de schimmel al het organische materiaal verbruikt, waardoor de resultaten aan de verwachtingen voldeden.

Interessant was de interactie tussen *Aspergillus* en *Nocardia*, waarbij de afbraak significant lager uitviel dan bij alleen *Nocardia* sp., en *Aspergillus niger* snel overheerste. Dit resultaat, vergelijkbaar met dat van alleen de schimmel, kan wellicht worden verklaard door onderzoek van Guo et al. (2020), dat aantoont dat *Aspergillus niger* sterke antibacteriële eigenschappen heeft. Dit suggereert dat de afbraakmechanismen van schimmel en bacterie elkaar mogelijk niet beïnvloeden.

Een ander opmerkelijk resultaat was dat van het grondmonster. In tegenstelling tot de bacterie en schimmel, waarbij een snelle toename van BZV werd waargenomen, liet het grondmonster een geleidelijke stijging zien, resulterend in 6,63% afbraak na 60 dagen. Dit in vergelijking met de maximale BZV bereikt door de bacterie en schimmel na 60 dagen, respectievelijk 5,00% en 0,40%.

Belangrijk om te benoemen is dat de testfles met het grondmonster nog geen plateau had bereikt aan het einde van de test periode zoals de andere flessen dat wel hadden. Het experiment met het grondmonster wordt hierom voor langere tijd opgeslagen op het lab. Periodiek zal data afgelezen kunnen worden om de biologische afbraak bij te houden. Ook zal het grondmonster doorgeënt worden in een andere fles met bandenslijpsel om zo verder het grondmonster te kunnen analyseren in toekomstige onderzoeken.

De bevindingen van dit onderzoek sluiten aan bij eerdere studies die de biologische afbraak van bandenloopvlak aantoonde, zoals die van Nielsen et al. (2023) en Tsuchii et al. (1985), met afbraakpercentages van respectievelijk ~5% en 7%.

7. Advies & Aanbevelingen

7.1 Advies

Tijdens het onderzoek zijn er vier verschillende scenario's onderzocht. De *Aspergillus niger*, *Nocardia sp.*, een grondmonster en een combinatie van de *Aspergillus niger* en de *Nocardia sp.* uit dit onderzoek is gebleken dat als een van de scenario's toegepast zal worden in de praktijk, dat het grondmonster uit verontreinigde bodem het grootste aandeel van het bandenslijpsel af kan breken. Verder onderzoek kan kijken naar het optimaliseren van omstandigheden en de gebruikte micro-organismen om de afbraak verder te versnellen.

Waar biologische afbraak op lange termijn een rol kan spelen is bijvoorbeeld in een zelfreinigende afwateringsgoot. Deze goten vangen het bandenslijpsel af in de berm wanneer deze van de weg afspoelen met het regenwater. In deze goot kan het afstromende water dan gefiltreerd worden waar bandenslijpsel, metalen en oliën die zich binden aan het filter. Gezien de concepten voor deze goten bedoeld zijn om lange termijn zonder interventie te functioneren, kan er door micro-organismen toe te passen gezorgd worden dat een deel van het rubberslijpsel wordt afgebroken in de goot.

Het biologisch afbreken van de deeltjes lost echter slechts een klein gedeelte van het probleem op. Bandenslijpsel emissies komen niet alleen in de bodem en oppervlaktewater terecht, ook komt een aandeel als fijnstof in de lucht, of stroomt het rubberslijpsel van het wegdek richting de bodem of het water. De deeltjes die in de lucht beëindigen kunnen makkelijker schade doen aan de luchtwegen van de mens en breken dus moeilijker af. Hierom zijn er alternatieve oplossingen waarnaar gekeken kan worden om emissies te voorkomen in plaats van de deeltjes achteraf op te ruimen.

Een voorbeeld van bandenslijpsel afvangen aan de bron, is een systeem ontworpen door 'The Tyre Collective'. Dit bedrijf houdt zich sinds 2020 bezig met het ontwerpen van een systeem dat het afvangen van bandenslijpsel zodra deze van de band afkomen mogelijk maakt door gebruik te maken van het elektrostatisch effect van bandenslijpsel en luchtstromen die van de band afkomen. Het systeem maakt gebruik van koperen plaatjes waar de negatief geladen bandenslijtagedeeltjes zich aan vast binden. Hiermee wordt voorkomen dat bandenslijpsel in het milieu terecht komen.

Een andere oplossing is om banden te produceren van duurzame materialen die makkelijker biologisch af te breken zijn. Zo publiceerde Goodyear in 2023 een campagne waarin ze een auto- en vrachtwagenband produceerde gemaakt van 70% hernieuwbare materialen. Ook zouden deze banden minder afhankelijk zijn van de olie-industrie.

7.2 Aanbevelingen

Er zijn dus een aantal concrete vervolgstappen die Heijmans nu al kan nemen om de verspreiding van bandenslijpsel emissies te voorkomen van haar eigen activiteiten, om op grote schaal veranderingen aan te brengen is meer onderzoek nodig. Voor de volgende onderwerpen is vervolgonderzoek nodig:

- De mechanica van rubber slijtage en hoe bandenslijpsel wordt gegenereerd;
 - o Er moeten meer inzichten komen over hoe de generatie van het bandenslijpsel een effect heeft op de samenstelling van stoffen in het bandenslijpsel.
- De generatie, transport en uitloggen van chemicaliën uit bandenslijpsel in water en het milieu die leiden tot adverse effecten voor mens en milieu;

- o Er is nog te weinig bekend over de schadelijke effecten van bandenslijpsel op het milieu.
- Het meten van bandenslijpsel in lucht-, bodem- en watermonsters;
 - o Bandenslijpsel is nog erg moeilijk en duur om aan te tonen in verschillende monsters. Er is veel voorbereiding nodig om bandenslijpsel aan te tonen in een grondmonster.
- Reactie van bandenslijpsel op het menselijk lichaam en effecten op de volksgezondheid;
 - o De gezondheidseffecten van bandenslijpsel zijn nog veelal onbekend, er moet meer inzicht komen hoe bandenslijpsel deeltjes interacteren met het menselijk lichaam.
- Inzicht in de stoffen gebruikt door bandenproductiebedrijven en meer inzicht op de milieu en gezondheidseffecten van de gebruikte additieven.
 - o Er is te weinig overzicht en inzicht in de additieven die worden gebruikt door bandenproductiebedrijven. Dit zorgt voor een groot risico voor de mens en het milieu wanneer de verspreiding van het bandenslijpsel niet wordt tegengegaan.

8. Dankbetuigingen

De auteur wil graag zijn dank uitspreken aan Jan Gerritse en Jorin Slagmeulen van het kennisinstituut Deltares in Utrecht voor hun waardevolle kennis en bijdragen aan het laboratoriumwerk. Ook gaat onze dank uit naar Jos Verheijen van Siba Autobanden in Uden voor het beschikbaar stellen van het bandenslijpsel dat essentieel was voor de experimenten.

9. References

- Andler, R., D'afonseca, V., Pino, J., Valdés, C., & Salazar-Viedma, M. (2021). *Assessing the Biodegradation of Vulcanised Rubber Particles by Fungi Using Genetic, Molecular and Surface Analysis*. *Frontiers Media SA*. 10.3389/fbioe.2021.761510
- Carrington, D. (2022, Jun 3). Car tyres produce more particle pollution than exhausts, tests show. *The Guardian (London)* <https://search.proquest.com/docview/2672664430>
- Cheng, X., Xia, M., & Yang, Y. (2023). *Biodegradation of vulcanized rubber by a gut bacterium from plastic-eating mealworms*. *Elsevier BV*. 10.1016/j.jhazmat.2023.130940
- El-Wafai, N. A., Farrag, A. M. I., Abdel-Basit, H. M., Hegazy, M. I., Al-Goul, S. T., Ashkan, M. F., Al-Quwaie, D. A., Alqahtani, F. S., Amin, S. A., Ismail, M. N., Yehia, A. A., & El-Tarabily, K. A. (2023). *Eco-Friendly Degradation of Natural Rubber Powder Waste Using Some Microorganisms with Focus on Antioxidant and Antibacterial Activities of Biodegraded Rubber*. *MDPI AG*. 10.3390/pr11082350
- Engelbrecht, A., Saad, H., Gross, H., & Kaysser, L. (2021). *Natural Products from Nocardia and Their Role in Pathogenicity*. *S. Karger AG*. 10.1159/000516864
- Gaete, A., Mandakovic, D., & González, M. (2020). *Isolation and Identification of Soil Bacteria from Extreme Environments of Chile and Their Plant Beneficial Characteristics*. *MDPI AG*. 10.3390/microorganisms8081213
- Gerritse, J., Leslie, H. A., De Tender, C. A., Devriese, L. I., & Vethaak, A. D. (2020). *Fragmentation of plastic objects in a laboratory seawater microcosm*. *Springer Science and Business Media LLC*. 10.1038/s41598-020-67927-1
- Ginsberg, G., Toal, B., & Kurland, T. (2011). Benzothiazole Toxicity Assessment in Support of Synthetic Turf Field Human Health Risk Assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(17), 1175-1183. 10.1080/15287394.2011.586943
- Guo, K., Zhang, Q., Zhao, J., Li, Z., Ran, J., Xiao, Y., Zhang, S., & Hu, M. (2020). *Antibacterial mechanism of Aspergillus niger xj spore powder crude extract B10 against Agrobacterium tumefaciens T-37*. *Informa UK Limited*. 10.1080/13102818.2020.1858722
- Hoeke, S., van Wijnen, J., Krikke, H., Löhr, A., & Ragas, A. M. J. (2024). Mapping the tire supply chain and its microplastics emissions using a multi-stakeholder approach. *Resources, Conservation and Recycling*, 203, 107389. 10.1016/j.resconrec.2023.107389
- Ibrahim, E. M. A., Arenskötter, M., Luftmann, H., & Steinbüchel, A. (2006). *Identification of Poly(cis -1,4-Isoprene) Degradation Intermediates during Growth of Moderately Thermophilic Actinomycetes on Rubber and Cloning of a Functional lcp Homologue from Nocardia farcinica Strain E1*. *American Society for Microbiology*. 10.1128/aem.72.5.3375-3382.2006
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). *Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals*. *Walter de Gruyter GmbH*. 10.2478/intox-2014-0009
- Jekel, M. (2019). *Scientific Report on Tyre and Road Wear Particles, TRWP, in the aquatic environment*.

- Joseph, A., Gupta, P., De, G., Lal, M., Meena, M. K., Singh, L. P., & Rattan, J. (2022a). *Biodegradation of Natural Rubber by Fungi and Bacteria*. Technoscience Publications. 10.46488/nept.2022.v21i03.010
- Kim, J., Park, E., Moon, H., Son, H., Hong, J., Wi, E., Kwon, J., Seo, D. Y., Lee, H., & Kim, Y. (2022). *Estimation of the concentration of nano-carbon black in tire-wear particles using emission factors of PM10, PM2.5, and black carbon*. Elsevier BV. 10.1016/j.chemosphere.2022.134976
- Laskar, N., & Kumar, U. (2019). *Plastics and microplastics: A threat to environment*. Elsevier BV. 10.1016/j.eti.2019.100352
- Melnick, R. L., Sills, R. C., Roycroft, J. H., Chou, B. J., Ragan, H. A., & Miller, R. A. (1994). Isoprene, an Endogenous Hydrocarbon and Industrial Chemical, Induces Multiple Organ Neoplasia in Rodents after 26 Weeks of Inhalation Exposure. *Cancer Research*, 54(20), 5333-5339. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/54/20/5333>
- Nielsen, A. F., Polesel, F., Ahonen, T., Palmqvist, A., Baun, A., & Hartmann, N. B. (2023). *Assessing the Biodegradability of Tire Tread Particles and Influencing Factors*. Wiley. 10.1002/etc.5757
- Panko, J., Kreider, M., & Unice, K. (2018). *Review of Tire Wear Emissions*. Elsevier. 10.1016/b978-0-12-811770-5.00007-8
- Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches*. Frontiers Media SA. 10.3389/fmicb.2020.562813
- Rose, K., & Steinbüchel, A. (2005). *Biodegradation of Natural Rubber and Related Compounds: Recent Insights into a Hardly Understood Catabolic Capability of Microorganisms*. American Society for Microbiology. 10.1128/aem.71.6.2803-2812.2005
- Röther, W., Austen, S., Birke, J., & Jendrossek, D. (2016). *Cleavage of Rubber by the Latex Clearing Protein (Lcp) of Streptomyces sp. Strain K30: Molecular Insights*. American Society for Microbiology. 10.1128/aem.02176-16
- Tan, Z., Berry, A., Charalambides, M., Mijic, A., Pearse, W., Porter, A., Ryan, M., Shorten, R., Stettler, M., Tetley, T., Wright, S., & Masen, M. (2023). *Tyre wear particles are toxic for us and the environment*. ().Imperial College London. 10.25561/101707 <https://search.datacite.org/works/10.25561/101707>
- Tian, Z., Zhao, H., Peter, K. T., Gonzalez, M., Wetzell, J., Wu, C., Hu, X., Prat, J., Mudrock, E., Hettinger, R., Cortina, A. E., Biswas, R. G., Vinicius, F., Kock, C., Soong, R., Jenne, A., Du, B., Hou, F., He, H., . . . Kolodziej, E. P. (2024). *A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon*
- Tsuchii, A., Suzuki, T., & Takeda, K. (1985). Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Appl. Environ. Microbiol.; (United States)*, 50:4 <https://www.osti.gov/biblio/5576047>
- Unciano, N. M., & Unciano, ©. *MICROBIAL PROCESSING OF NATURAL RUBBER WASTE*
- Van Broekhuizen, P. (2022). *Case Study Rubber Tyres - Airborne release of tyre wear particles*10.13140/RG.2.2.17576.24329

Verschoor, A., Bellert, B., Dienst, R. /., Leefomgeving, E., Peijnenburg, W., Herremans, J., & Bodar, C. *Inventarisatie en prioritering van bronnen en emissies van microplastics*.

Wagner, S., Hüffer, T., Klöckner, P., Wehrhahn, M., Hofmann, T., & Reemtsma, T. (2018). Tire wear particles in the aquatic environment - A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects. *Water Research*, 139, 83-100. 10.1016/j.watres.2018.03.

Kim, J., Park, E., Moon, H., Son, H., Hong, J., Wi, E., Kwon, J. T., Seo, D. Y., Lee, H., & Kim, Y. (2022). Estimation of the concentration of nano-carbon black in tire-wear particles using emission factors of PM₁₀, PM_{2.5}, and black carbon. *Chemosphere*, 303(Pt 1), 134976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134976>

Bijlagen

B1 - Recepten media - Aangeleverd door DSMZ

B1.1 - 53. CORYNEBACTERIUM BROTH (opkweek *Nocardia* sp.)

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Casein peptone, tryptic digest | 10.0 g |
| Yeast extract | 5.0 g |
| Glucose | 5.0 g |
| NaCl | 5.0 g |
| Distilled water | 1000.0 ml |

Pas aan naar pH 7.2 - 7.4. (7.2 gebruikt voor dit experiment)

B2.2 - 457. BRUNNER MINERAL MEDIUM (groei medium voor alle experimenten)

| | |
|-------------------------------------------------|------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 2.44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.52 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.50 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.20 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0.05 g |
| Trace element solution SL-4 (see below) | 10.00 ml |
| Distilled water | 1000.00 ml |

Pas aan naar pH 6.9.

Bereid een afzonderlijke oplossing van de fosfaten en autoclaaf afzonderlijk. Combineer de twee oplossingen na afkoelen.

Trace element solution SL-4:

| | |
|-----------------------------------------|-----------|
| EDTA | 0.50 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.20 g |
| Trace element solution SL-6 (see below) | 100.00 ml |
| Distilled water | 900.00 ml |

Trace element solution SL-6:

| | |
|-------------------------------------------------------|------------|
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.10 g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0.03 g |
| H ₃ BO ₃ | 0.30 g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.20 g |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 0.01 g |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.02 g |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0.03 g |
| Distilled water | 1000.00 ml |

B2 - Controle experimenten

B2.1 - Controle experiment - Massabepalingen

Voordat er werd de massabepalingen werden uitgevoerd, werden er meerdere controles gedaan om te zien hoeveel massaverlies er zou optreden tijdens de filtratie en terugwinning van de bandenslijtage deeltjes. Ook werden er hier ideeën getest om het massa verlies zo klein mogelijk te houden op verschillende wijzen.

B2.1.1 - Filtratie met 0,22 µm Millipore membraam filter met vacuüm filtratie met trechter, Microfil® 3 heads filtration.

Het eerste experiment wat werd uitgevoerd was filtratie met een zo'n klein mogelijk filter in een opstelling waar drie flessen tegelijkertijd gefiltreerd kunnen worden **zie figuur x**. Het voordeel van de opstelling is dat er op deze manier veel monsters tegelijkertijd gefiltreerd konden worden wat voordelig is gezien het een relatief langzaam proces is met een filter met een kleine porie grootte.

Het nadeel van deze opstelling was echter dat de randen van de trechters over het filter heen kwamen waar veel bandenslijtagedeeltjes zich aan vastplakte. Er bleef dusdanig veel op de trechter zitten dat deze methode als snel geschrapt werd voor een beter alternatief omdat deze rubber deeltjes te moeilijk terug te winnen waren. Dit werd al na visuele inspectie vastgesteld en er zijn hierom geen controle tests uitgevoerd.



Figuur B1 - geteste Microfil® 3 heads filtratie opstelling.

B2.1.2 - Filtratie met 8,0 µm Millipore membraam filter met vacuüm filtratie met andere filtratie opstelling, Nalgene® 300-4000 Reusable 1L Vacuum Filter Holder with Funnel & Receive.

In de tweede poging werd er gekeken of een grotere poriegrootte zou helpen om het medium sneller te filtreren waardoor de deeltjes minder tijd hadden zich te hechten aan de trechter. Ook werd er een nieuwe filtratie opstelling gebruikt met een trechter met aflopende randen waar minder bandenslijtagedeeltjes zich aan zouden hechten, zie figuur B2.



Figuur B2 - Geteste Nalgene® Reusable 1L Vacuum Filter vacuümfiltratie opstelling en membraamfilters

Het nadeel van deze opstelling is echter dat het wat moeilijker schoon te maken was na gebruik en dat er dus maar één fles tegelijkertijd geleegd kon worden. Echter bleven er minder deeltjes aan de randen plakken wat leidde tot minder massa verlies en de deeltjes die wel aan de randen plakten waren makkelijker terug te winnen door de deeltjes met een borstel in een aluminium weegbakje te vegen. Zie figuur B3 voor een voorbeeld hoe de rubberdeeltjes zich vastplakte aan de trechter.



Figuur B3 - Aan de onderzijde van de trechter blijven enkele bandenslijtagegedeeltes plakken. Deze konden na drogen zorgvuldig weggeveegd en opgevangen worden.

Na vijf controles uit te hebben gevoerd kwam de gemiddelde massaverlies uit op 1,96mg met een standaardafwijking van $\pm 1,75$ mg. Tabel B1 laat de resultaten van de controles zien. De conclusie van de tests was dat deze filtratie methode goed genoeg was om de massa-afname nauwkeurig te meten.

Tabel B1 - Controle test filtratie met trechter en borstel.

| Test # | Massa rubber voor (mg) | Massa rubber na (mg) | Massa-afname (mg) |
|-------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 215,3 | 211,3 | 4,0 |
| 2 | 197,8 | 196,6 | 1,2 |
| 3 | 204,9 | 201,3 | 3,6 |
| 4 | 201,5 | 201,5 | 0,0 |
| 5 | 193,8 | 192,8 | 1,0 |
| Gemiddelde | - | - | 1,96 \pm 1,75 |

B2.1.3 - Büchner trechter met 8,0 μ m Millipore membraam filter.

Ook waren er diverse Büchner trechter aanwezig op het lab die overwogen werden, echter werd na een simpele test geconcludeerd dat het te onnauwkeurig was omdat het filter uit de trechter getild moest worden, waar er al snel rubber deeltjes van het filter af zouden vallen. Ook zouden er rubberdeeltjes naast het filter vallen omdat dit trechter type niet volledig om het membraamfilter klemde zoals de vorige twee opstellingen. Hierom zijn ook hier geen controle tests mee gedaan.



Figuur B 4 - Voorbeeld van een geteste Büchner trechter

B2.2 - Controle experiment - Oplossen van biomassa

Om de massabepalingen zo nauwkeurig mogelijk vast te kunnen leggen, was het idee om voor de massabepaling van de bandenslijtagedeeltjes uit te voeren, het gevormde biomassa van de micro-organismen op te lossen. Het gevormde biofilm of schimmelsporen zouden immers bijdragen aan de totale massa van de massametingen en hierdoor de resultaten vertekenen.

In al het eerder onderzoek over het verwijderen van biofilms of schimmelsporen werd geconcludeerd dat er een mechanische poets stap moet volgen om de biomassa effectief van de deeltjes te krijgen. Vanwege de kleine deeltjesgrootte (<500um), was dit geen optie en moest er dus getest worden of het mogelijk was biomassa op chemische wijze te verwijderen van de deeltjes, door ze kapot te oxideren met waterstofperoxide, te hydrolyseren met natronloog of op te lossen met aceton

Het oplossen van de biomassa is op 3 verschillende manier geprobeerd; oplossen in waterstofperoxide, oplossen in aceton, en oplossen in kokend natronloog. In deze controles werd er getest of de methode microbiële biomassa op kon lossen, wat de interactie is met de bandenslijtagedeeltjes en welke filters bestendig waren tegen het oplosmiddel. Deze bijlage laat zien hoe deze experimenten werden uitgedragen en wat de resultaten zijn van de stappen.

B2.2.1 - Oplossen in 15% Waterstofperoxide (H₂O₂)

In eerder onderzoek van (Gerritse et al., 2020) werd gesteld dat waterstofperoxide een effectieve manier was om biofilms van plastic te verwijderen. In dit onderzoek werden grotere stukken plastics waar biofilms op waren gevormd in waterstofperoxide gelegd en vervolgens schoon gemaakt met een borstel. In dit onderzoek werd dit nagebootst zonder de borstel stap vanwege de te kleine deeltjesgrootte om de kijken of dit een effectieve manier was om biofilms op te lossen.

In de eerste poging om microbiële biomassa op te lossen werd in een zuurkast in een erlenmeyer 50ml Brunner medium toegevoegd en 50ml 30% waterstofperoxide. Hierin werd vervolgens 5 milliliter biomassa suspensie toegevoegd van het grondmonster, de *Nocardia sp.* en de *Aspergillus niger*. Vervolgens werd gedurende 4 uur op een roerplaat gezet bij 200 rpm.

Na 4 uur was er geen duidelijk zichtbare afname in de hoeveelheid biomassa van het grondmonster, de *Nocardia sp.* of de *Aspergillus niger*. Hierdoor was de conclusie dat dit geen effectieve manier was om het biomassa op te lossen. Ander onderzoek toonde ook aan dat waterstofperoxide de bandenslijtagedeeltjes kapot zou kunnen oxideren wat de massametingen negatief zou beïnvloeden. Hierdoor zijn er geen verdere tests gedaan over de effecten van waterstofperoxide op bandenslijtagedeeltjes en de diversie filter types aanwezig op het lab.

B2.2.2 - Oplossen in 95% Aceton

De tweede poging om bacteriële biomassa op te lossen was met 99,9% aceton. Voor deze test werd er in een erlenmeyer 15ml 99,9% aceton gedaan en daarna 5ml biomassa suspensie toegevoegd van het grondmonster, de *Nocardia sp.* en de *Aspergillus niger*. Deze werden gedurende 3 uur in de zuurkast gezet en periodiek geobserveerd. Na 3 uur was er geen significant zichtbare afname van de biomassa. Hierdoor was de conclusie dat dit geen effectieve manier was om het biomassa op te lossen. Hierdoor zijn er geen verdere

tests gedaan over de effecten van aceton op bandenslijtagedeeltjes en de diversie filter types aanwezig op het lab

B2.2.3 - Koken in natronloog (1M NaOH)

Voor deze test werd 5 ml biomassa suspensie toegevoegd aan 100ml Brunner medium, hier werd vervolgens 4 gram NaOH pellets toegevoegd om het mengsel op 1M NaOH te brengen. Vervolgens werden de diverse testflessen in een bad met kokend water gezet om het mengsel aan de kook te brengen. Na 10 minuten waren de flessen 100 graden Celsius en werden de mengsels gedurende 10 extra minuten gekookt. Na het koken werden de flessen uit het waterbad gehaald en werden deze aan de lucht afgekoeld in een zuurkast. Hierna kon het mengsel geneutraliseerd worden met 10,15M HCl. In stappen van 0,5ml werd er 8,5ml 10,15M HCl toegevoegd aan het mengsel om zo het mengsel terug te brengen naar pH 7. Het geneutraliseerde mengsel kon vervolgens getest worden met een pH strip en veilig gefiltreerd worden met de gewenste filtratie methode.

Met visuele inspectie was te zien dat vrijwel alle bacteriële biomassa van de *Nocardia sp.* en het grondmonster waren opgelost. Echter waren de schimmelsporen van de *Aspergillus niger* nog vrijwel onaangetast. Er werd geschat dat er honderd milligram *Aspergillus niger* biomassa gevormd zou worden op basis van de hoeveelheid organisch materiaal in het opweekmedium: in 5ml biomassa suspensie zou 200 milligram koolstof benut kunnen worden van het aardappeldextrose bouillon opweekmedium zitten met een koolstofbenuttingsfactor van 50% wat leidt tot 100 milligram biomassa.

Dit werd later getest door alle test flessen geheel te filtreren en goed nagespoeld op een 0,22 µm membraam filter. Dit gaf de volgende resultaten in tabel B2. De *Nocardia sp.* vervalt omdat de fles werd omgestoten, echter gaf de visuele inspectie en de resultaten van het grondmonster genoeg informatie om door te gaan met deze methode om het biomassa op te lossen. Hierdoor is ervoor gekozen om deze methode toe te passen op alle flessen voordat deze gewogen werden.

Tabel B2 - Controle test biomassa na koken in 1M NaOH.

| Fles nr. | Test | Massa filter (mg) | Massa filter na filtratie (mg) | Biomassa (mg) |
|----------|---------------------|-------------------|--------------------------------|---------------|
| 1 | <i>Nocardia sp.</i> | 60,4 | 61,1 | 0,7 |
| 2 | <i>A. niger</i> | 61,5 | 163,4 | 101,9 |
| 3 | Grondmonster | 60,3 | 63,0 | 2,7 |

B3 - Sustainability - assignment 4 voor Avans

758 woorden exclusief quotes

Heijmans houdt zich al jaren bezig met het waarborgen van de sustainable development goals (SDG's). Zo heeft Heijmans in 2022 het Cobouw Duurzaamheid en SDG-award gewonnen voor haar inzet in transparante rapportage over haar duurzaamheidsdoelstelling. In deze bijlage wordt er weergegeven hoe dit project aansluit op de sustainable development goals en hoe Heijmans als bedrijf zich hard maakt voor de verduurzaming van de sector.

SGD 3.9 Goede gezondheid en welzijn - People



"Tegen 2030 in aanzienlijke mate het aantal sterfgevallen en ziekten verminderen als gevolg van gevaarlijke chemicaliën en de vervuiling en besmetting van lucht, water en bodem."

Zoals omschreven in het theoretisch kader bevatten bandenslijtagedeeltjes een aantal stoffen en additieven die schadelijk zijn voor mens en milieu. Ook kan vooral in urbane gebieden bandenslijtage een bijdrage leveren aan het verslechteren van de luchtkwaliteit. Dit project hoopt een manier te ontwikkelen om deze deeltjes in het milieu af te breken. Hoe minder deeltjes er in het milieu verspreid liggen, des te minder deeltjes er in de bodem, het water en in de lucht terecht komen als gevolg van ophoping. In urbane gebieden is de mate van bandenslijtage hoger per kilometer dan bijvoorbeeld op de snelweg vanwege veel snelheidsveranderingen, bochten en slechter wegdek. Precies in deze gebieden is het belangrijk om microplastics emissies te beperken om de goede gezondheid te waarborgen.

SDG 11.6 Duurzame steden en gemeenschappen - Planeet

"Tegen 2030 de nadelige milieu-impact van steden per capita reduceren, ook door bijzondere aandacht te besteden aan de luchtkwaliteit en aan het gemeentelijk en ander afvalbeheer."



De impact van grote steden op het milieu is erg hoog, dit project hoopt de impact van steden op het milieu te verminderen door aandacht te besteden aan afvalbeheer en luchtkwaliteit. Het recyclen van autobanden is op zich al een uitdaging om te recyclen, de bandenslijtagedeeltjes zijn dus nog veel erger. Niet alleen zijn ze bijna onzichtbaar voor het blote oog, ze zijn ook nog eens diffuus verspreid door het milieu wat de deeltjes efficiënt oprapen praktisch onmogelijk maakt. Met microbiële degradatie kom je in ieder geval van de deeltjes af wat voorkomt dat de rubbers zich ophopen in het milieu. Auto vervoer is nou eenmaal een cruciaal vervoersmiddel voor miljarden mensen op aarde, dus van rubberen autobanden komen we voorlopig niet af. Ook zal dit een bijdrage leveren aan luchtkwaliteit omdat de rubberdeeltjes niet opnieuw de lucht in worden gebracht als er auto's door een verontreinigd gebied rijden.

Ook zet Heijmans Infra B.V. zich al jaren in om duurzame steden en gemeenschappen te creëren. Zo wordt er flink geïnvesteerd in het bouwen van voldoende woningen met lagere CO₂-uitstoot en zijn ze voortdurend bezig met innovatieve nieuwe bouw concepten. Een mooi voorbeeld is het bouwen van houtskeletwoningen met een lagere ecologische afdruk dan traditionele woningen. Zo heeft Heijmans in 2022 de Cobouw SDG-award gewonnen door hun uitgebreide rapportage over duurzaamheidsdoelen en het opstellen van concrete kpi's.

SDG 12.4 Verantwoorde consumptie en productie - Profit



“Tegen 2020 komen tot een milieuvriendelijk beheer van chemicaliën en van alle afval gedurende hun hele levenscyclus, in overeenstemming met afgesproken internationale kaderovereenkomsten, en de uitstoot aanzienlijk beperken in lucht, water en bodem om hun negatieve invloeden op de menselijke gezondheid en het milieu zoveel mogelijk te beperken.”

Voor Heijmans is dit project van belang zodat zij het opruimen van deze vorm van microplastics aan kan bieden als een van haar diensten als makers van de gezonde leefomgeving. Maar ook voor de wereld is dit project belangrijk. Dit project doelt een duurzame manier te ontwikkelen voor het opruimen van bandenslijtage afval. Dit zorgt ervoor dat naast het opruimen van banden afval dat voor en na het gebruik plaatsvindt, dat er nu ook een procedure komt om het afval dat geproduceerd wordt tijdens het gebruik van de banden, ook op wordt geruimd. Hiermee is dan ook dat aandeel van de levenscyclus van autobanden gedekt. Omdat dit afval nadelige gevolgen heeft op mens en milieu, en het afval dat gevormd wordt in de bodem, het water en de lucht terecht komt, zou dit onderzoek overheden helpen informeren over manieren om van dit type afval op een duurzame manier op te ruimen.

Ook hier is Heijmans als bedrijf al sinds 2020 bezig met het verduurzamen van haar consumptie en productie. Zo worden er duurzame natuurlijke hulpbronnen gebruikt, CO₂-emissies gereduceerd, worden restmaterialen gescheiden en hergebruikt, en wordt verpakkingsmateriaal sinds 2020 100% hergebruikt. Ook werd in het SDG-award genoemd dat Heijmans zich sterk inzet om de hele bouwketen te verduurzamen.

SDG 14.1 Leven in het water en SGD 15.5 Leven op het land - Planeet



“Tegen 2025 de vervuiling van de zee voorkomen en in aanzienlijke mate verminderen, in het bijzonder als gevolg van activiteiten op het land, met inbegrip van vervuiling door rondrijvend afval en voedingsstoffen.”

“Dringende en doortastende actie ondernemen om de aftakeling in te perken van natuurlijke leefgebieden, het verlies van biodiversiteit een halt toe te roepen en, tegen 2020, de met uitsterven bedreigde soorten te beschermen en hun uitsterven te voorkomen.”

Hoewel de exacte gevolgen van microplastic vervuiling nog onduidelijk zijn, is er al wel menigeen bekend over de negatieve gevolgen geassocieerd met het uitlogen van gevaarlijke stoffen uit bandenslijtage deeltjes. Verschillende additieven in autobanden zijn bijvoorbeeld gelinkt aan de sterfte van zalm en muizenpopulaties in

het water en op het land. Het opruimen van deze deeltjes zorgt dus voor een bijdrage aan het welzijn van leven in het water en op het land. Dit zal voorkomen dat er verlies van biodiversiteit optreedt.

Heijmans als bedrijf houdt zich ook bezig met dit onderwerp. Zo maken de afdelingen bodem en water zich hard voor het saneren van verontreinigingen die aangetroffen worden in gebieden waar Heijmans werkzaam is. Zo houden ze het milieu schoon en wordt het leven op land en in water beschermt en werken ze hard aan nieuwe technologieën om dit te waarborgen.