

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)  
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
34281—  
2017

---

## ОКСО-БИОРАЗЛАГАЕМАЯ УПАКОВКА

Метод оценки оксо-биodeградации  
полимерных пленок

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2018

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 223 «Упаковка»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 сентября 2017 г. № 103-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 - 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 февраля 2018 г. № 62-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34281—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 октября 2018 г.

5 Настоящий стандарт разработан с учетом основных нормативных положений национального стандарта Франции АС Т51-808—2012 «Пластмассы. Оценка оксо-биоразлагаемости полиолефиновых материалов в виде пленок. Методология и требования» («Plastics — Assessment of oxobiodegradability of polyolefinic materials in the form of films — Methodology and requirements», NEQ)

### 6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет ([www.gost.ru](http://www.gost.ru))*

© Стандартинформ, 2018

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины, определения и сокращения	1
4 Сущность метода	2
4.1 Общие положения	2
4.2 Абиотическое разложение	2
5 Типы оксо-биоразлагаемого материала	2
5.1 Классификация пленок	3
6 Оценка абиотического разложения	3
6.1 Общие положения	3
6.2 Подготовка образцов	4
6.3 Подготовка к испытанию	4
6.4 Испытание 1. Термоокисление	4
6.5 Испытание 2. Фотоокисление	4
6.6 Испытание 3. Термоокисление предварительно фотоокисленных пленок	5
6.7 Требования	6
7 Метод оценки приобретенной биоразлагаемости	7
8 Обработка результатов	11
Приложение А (справочное) Определение АТФ	12
Приложение Б (справочное) Примеры зависимости изменения концентрации АТФ от времени	13
Библиография	14

## ОКСО-БИОРАЗЛАГАЕМАЯ УПАКОВКА

## Метод оценки оксо-биодegradации полимерных пленок

Oxo-biodegradable packaging. Method for the assessment of oxo-biodegradation of polymer films

Дата введения — 2018—10—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки оксо-биодegradации полимерных пленок.

Стандарт распространяется на пленки из полиолефинов толщиной не более 250 мкм.

Стандарт определяет типы оксо-биоразлагаемых материалов и пленок в зависимости от продолжительности хранения, температуры и места использования.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 9.707—81 Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные. Методы ускоренных испытаний на климатическое старение

ГОСТ 11262—80 Пластмассы. Метод испытания на растяжение

ГОСТ 14359—69 Пластмассы. Методы механических испытаний. Общие требования

ГОСТ 17035—86 Пластмассы. Методы определения толщины пленок и листов

**Примечание** — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

## 3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **биодegradация**: Разложение полимерной системы в результате происходящих в клетках (ячейках) явлений.

3.1.2 **биоразлагаемость**: Способность к биологическому разложению.

3.1.3 **приобретенная биоразлагаемость**: Способность небiorазлагаемого полимера к биологическому разложению после искусственного или естественного химического преобразования.

3.1.4 **оксо-биодegradация**: Биологическое разложение, являющееся следствием окислительных и происходящих в клетках явлений одновременно или последовательно.

3.1.5 **абиотическое разложение**: Небиологическое разложение. Разложение вещества с помощью химических или физических процессов, например гидролиза, восстановления или окисления.

## 3.1.6

**деградация (разложение):** Изменение первоначальных свойств вследствие химического расщепления макромолекул, формирующих полимерный элемент, независимо от механизма расщепления.

[ГОСТ 33747—2016 статья 3.4]

**3.1.7 аденозинтрифосфат; АТФ:** Молекула, которая обеспечивает энергию, необходимую для обменных химических реакций, посредством гидролиза в биохимических процессах всех известных живых организмов.

**Примечание** — В настоящем стандарте АТФ применяют для измерения количества активной биомассы в воде и на поверхностях частиц материала.

**3.1.8 толщина пленки:** Средняя толщина пленки  $e$ , мкм.

## 3.2 Сокращения, применяемые в настоящем стандарте

В настоящем стандарте применяют следующие сокращения:

АМФ — аденозинмонофосфат;

АДФ — аденозиндифосфат;

АТФ — аденозинтрифосфат.

## 4 Сущность метода

### 4.1 Общие положения

Воздействие тепла (термоокисление) и/или света (фототермическое окисление) позволяет материалу достичь уровня окисления, достаточного для начала биоразложения, что относят к приобретенной биоразлагаемости. В этом случае испытание по оценке биоразлагаемости обеспечивает контроль пригодности окисленного полимерного материала к биоразложению и его микротоксичности.

### 4.2 Абиотическое разложение

Для долгосрочного прогнозирования поведения полимерного материала, находящегося в окружающей среде, необходимо создать лабораторные условия ускоренных испытаний. В лабораторных условиях возможно ускорить только химические превращения, которые являются основой физических изменений полимерного материала, таких как механодеструкция. Коэффициент ускорения может быть правильно определен только на основании химических превращений.

Исследования зависимости изменений полиолефинов от времени показали, что в естественных условиях процессами разложения управляют фототермическое окисление (т.е. совместное воздействие света и тепла) и термическое окисление. Развитие этих видов окисления определяется накоплением карбоксильных групп, которое можно определить с использованием инфракрасной (ИК) Фурье-спектроскопии. Увеличение поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$ , которое определяет относительное содержание кислотных групп, выражают толщиной  $e$  пленки.

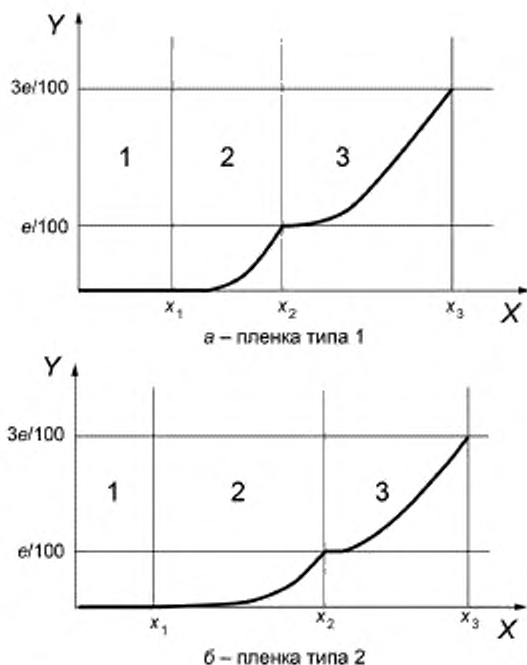
## 5 Типы оксо-биоразлагаемого материала

В настоящем стандарте установлены два типа оксо-биоразлагаемых материалов:

- тип 1 — оксо-биоразлагаемые материалы с термостабильностью, контролируемой при хранении, способные воспринимать кратковременное воздействие ультрафиолета во время использования,
- тип 2 — оксо-биоразлагаемые материалы, стабильность которых контролируется при хранении и использовании, которые могут воспринимать длительное воздействие ультрафиолета во время использования.

На рисунке 1 показано возрастание поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$  в зависимости от времени для кислотных групп (выраженное в толщине пленки) соответственно для материалов типов 1 и 2.

**Примечание** — Кривые, показанные на рисунке 1, относят к материалам, имеющим характеристики, соответствующие минимальным значениям, —  $e/100$  и  $3e/100$ .



Область 1	Область 2	Область 3
Хранение в темноте и при контролируемой температуре	Применение	Завершающий этап жизненного цикла
Без окисления	Инициация фототермического окисления <sup>1)</sup> и фрагментации	Продолжение термического окисления для достижения достаточной степени окисления, обеспечивающей начало процесса биоразложения полимера
<sup>1)</sup> Для пленки типа 2 начало фототермического окисления задерживается по сравнению с типом 1, чтобы сохранить функциональные свойства продукции.		

$x$  — продолжительность, ч;  $y$  — увеличение поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$  при толщине пленки  $e$ , мкм

Рисунок 1 — Поглощение в зависимости от времени

### 5.1 Классификация пленок

Типы пленок, изготовленных из оксо-биоразлагаемых материалов, приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Типы пленок из оксо-биоразлагаемых материалов

Тип пленки	Продолжительность хранения и использования в закрытом помещении, мес	Температура хранения, °С
A	12	20
B	24	20
C	12	30
D	24	30

## 6 Оценка абиотического разложения

### 6.1 Общие положения

Для установления свойств полимерных пленок при воздействии света и температуры проводят испытания 1, 2 и 3.

## 6.2 Подготовка образцов

Для получения необходимых параметров пленки от партии продукции методом случайного отбора выбирают образцы. Количество образцов устанавливают в технической документации на конкретные виды пленок, и оно должно быть достаточным для проведения испытаний.

## 6.3 Подготовка к испытанию

### 6.3.1 Измерение толщины пленки

Толщину пленки определяют по ГОСТ 17035.

### 6.3.2 Инфракрасная Фурье-спектроскопия

ИК Фурье-спектроскопия — это спектроскопия, изучающая взаимодействие инфракрасного излучения с веществом. Инфракрасный спектр содержит ряд полос поглощения. По специальным таблицам частота поглощения соотносится с наличием в веществе определенных молекулярных фрагментов.

Увеличение поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$  с использованием инфракрасного излучения ИК Фурье-спектрометрии определяют по стандарту [1].

### 6.3.3 Механические характеристики пленки при растяжении

Для учета изменений полимерных материалов вместо ИК Фурье-спектроскопии при испытаниях 1 и 2 допускается применять определение характеристик при растяжении (например, для контроля на производстве).

Характеристики при растяжении определяют в соответствии с ГОСТ 11262 и ГОСТ 14359, используя три образца типа 2, разрезанных в продольном направлении пленки, при скорости перемещения 100 мм/мин.

Использование другого типа образцов и скорости перемещения, отличной от 100 мм/мин, допускается, если все испытания на растяжение (включая испытание пленки в исходном состоянии) проводят в одинаковых условиях.

При разногласиях в оценке качества пленки рекомендуется применять метод с использованием ИК Фурье-спектроскопии.

## 6.4 Испытание 1. Термоокисление

Образцы помещают в азрированный вентилируемый термостат при температуре и на время, которые указаны в таблице 2, согласно типу испытываемой пленки.

Т а б л и ц а 2 — Продолжительность испытаний и температура

Тип	Температура, °С	Продолжительность испытания $t_1$ , ч
A	$60 \pm 2$	400
B	$60 \pm 2$	800
C	$70 \pm 2^1)$	320
D	$70 \pm 2^1)$	640

<sup>1)</sup> Для термоусадочных пленок типов C и D допускается проводить испытание при  $(60 \pm 2) \text{ °С}$ . Продолжительность испытания должна быть 800 и 1600 ч соответственно.

## 6.5 Испытание 2. Фотоокисление

### 6.5.1 Сущность испытания

Неиспользованные и несостаренные образцы размещают в камере ускоренного фотостарения с использованием паросветных ртутных ламп среднего давления при следующих условиях:

а) температуру воздействия на поверхности образцов контролируют и поддерживают в пределах  $(60 \pm 1) \text{ °С}$ ;

б) не допускается образцы обрызгивать водой при нахождении их в камере фотостарения.

### 6.5.2 Условия испытания для материалов типа 1

Продолжительность воздействия в камере ускоренного фотостарения должна быть эквивалентна 3—5 мес воздействия прямых солнечных лучей, тепла и атмосферного кислорода. Продолжительность зависит от местного климата, где используются пленки. Продолжительность воздействия на образец приведена в таблице 3.

Таблица 3 — Продолжительность воздействия

Климат	Продолжительность испытания $t_{2, ч}$
Умеренный климат (центральная и северная Европа)	100
Средиземноморский климат (южная Европа, Средний Восток и север Африки)	150

### 6.5.3 Условия испытания для материалов типа 2

6.5.3.1 Воздействие на пленку прямых солнечных лучей в период жизненного цикла разделяют на:

- первый период  $t_{31}$  — использование пленки под прямыми солнечными лучами;
- второй период  $t_{3T}$  (общая продолжительность воздействия) — удаление в окружающую среду.

Продолжительность воздействия на образец должна соответствовать значениям, приведенным в таблице 4. Контроль изменения поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$  проводят два раза: первый раз — после первого периода воздействия,  $t_{31}$ , второй раз — по истечении общей продолжительности воздействия  $t_{3T}$ , как показано в таблице 4.

Таблица 4

Климат	Продолжительность испытаний при использовании			
	в течение 6 мес		в течение 12 мес	
	Первый период $t_{31, ч}$	Общая $t_{3T, ч}$	Первый период $t_{31, ч}$	Общая $t_{3T, ч}$
Умеренный климат (центральная и северная Европа)	150	250	300	450
Средиземноморский климат (южная Европа, Средний Восток и север Африки)	220	370	450	600

6.5.3.2 Воздействие на пленку солнечных лучей, проходящих через стекло в первой части жизненного цикла, разделяют на:

- первый период  $t_{41}$  — использование под солнечными лучами, прошедшими через стекло;
- второй период  $t_{4T}$  (общая продолжительность воздействия) — удаление в окружающую среду.

Продолжительность воздействия на образец должна соответствовать значениям, приведенным в таблице 5. Во время этого испытания изменение поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$  проводят два раза: первый раз — после первого периода воздействия  $t_{41}$ , второй раз — по истечении общей продолжительности воздействия  $t_{4T}$ , как показано в таблице 5.

Таблица 5 — Продолжительность воздействия

Климат	Продолжительность испытаний при использовании							
	в течение 3 мес		в течение 6 мес		в течение 12 мес		в течение 18 мес	
	Первый период $t_{41, ч}$	Общая $t_{4T, ч}$	Первый период $t_{41, ч}$	Общая $t_{4T, ч}$	Первый период $t_{41, ч}$	Общая $t_{4T, ч}$	Первый период $t_{41, ч}$	Общая $t_{4T, ч}$
Умеренный климат	20	120	40	140	70	170	110	210
Средиземноморский климат	30	180	60	210	105	255	165	315

### 6.6 Испытание 3. Термоокисление предварительно фотоокисленных пленок

Используют образцы материала, которые после испытания 2 достигли поглощения не менее  $\alpha/100$ . Образцы помещают в азрированный вентилируемый термостат на 300 ч при температуре  $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .



## 6.7 Требования

6.7.1 Увеличение поглощения на  $1,714 \text{ см}^{-1}$ 

По окончании испытаний в соответствии с испытаниями 1, 2 и 3 при указанной продолжительности испытаний в соответствии с типом материала, типом пленки и продолжительностью использования пленка должна соответствовать требованиям, приведенным в таблице 6.

Таблица 6

Испытание	Область (см рисунок 1)	Тип оксо-биоразлагаемого материала	Продолжительность испытания, ч	Увеличение поглощения на $1,714 \text{ см}^{-1}$ при толщине $e$ , мкм
Испытание 1. Термоокисление	Хранение в темноте при контролируемой температуре	Тип 1, тип 2	$t_1$ (см. таблицу 2)	$\leq e/100$
Испытание 2. Фотоокисление	Использование	Тип 1	$t_2$ (см. таблицу 3)	$\geq e/100$
		Тип 2: Пленка подвержена воздействию прямых солнечных лучей в первой части жизненного цикла	$t_{31}$ (см. таблицу 4)	$\leq e/100$
			$t_{3T}$ (см. таблицу 4)	$\geq e/100$
		Пленка подвержена воздействию солнечных лучей через стекло в первой части жизненного цикла	$t_{41}$ (см. таблицу 5)	$\leq e/100$
$t_{4T}$ (см. таблицу 5)	$\geq e/100$			
Испытание 3. Термоокисление предварительно фотоокисленной пленки	Окончание срока службы	Тип 1, тип 2	300	$\leq 3e/100$ <sup>1)</sup>
<sup>1)</sup> Увеличение поглощения на $1,714 \text{ см}^{-1}$ по отношению к исходному состоянию пленки. <b>Примечания</b> 1 Условия испытания 1 позволяют проверить, что после выдерживания образцов определенное время при определенной температуре термоокисление полимерного материала находится на самой ранней стадии. 2 Для умеренного климата, например, условия испытания 2 гарантируют, что пленки типа 1, попадая в окружающую среду, распадутся через 3—5 мес в зависимости от времени года. 3 Для пленки типа 1 условия испытания 3 гарантируют, что пленка, которая абиотически разложилась после воздействия солнечного света, тепла и атмосферного кислорода в течение 3—5 мес, а затем пролежала 2—3 года в почве, приобретет свойство биоразлагаемости.				

## 6.7.2 Прочность при растяжении и деформация при разрыве (испытания 1 и 2)

Наряду с требованиями, приведенными в таблице 6, при проведении испытаний 1 и 2 и при указанной продолжительности испытаний в соответствии с типом материала, типом пленки и продолжительностью использования пленка должна соответствовать требованиям, приведенным в таблице 7.

**Примечание** — После продолжительности испытания  $t_3$  уровень распада пленки не позволяет проводить испытания прочности на разрыв.

Таблица 7

Испытание	Область (рисунок 1)	Тип материала	Продолжительность испытания, ч	Относительное удлинение $R^1$ , %
Испытание 1. Термоокисление	Хранение в темноте при контролируемой температуре	Тип 1, тип 2	$t_1$ (см. таблицу 2)	$> 80$

Окончание таблицы 7

Испытание	Область (рисунок 1)	Тип материала	Продолжительность испытания, ч	Относительное удлинение $R^{1)}$ , %
Испытание 2. Фотоокисление	Использование	Тип 1	$t_2$ (см. таблицу 3)	< 20
		Тип 2: Пленка подвержена воздействию прямых солнечных лучей в первой части жизненного цикла	$t_{3I}$ (см. таблицу 4)	> 80
			$t_{3T}$ (см. таблицу 4)	< 20
		Пленка подвержена воздействию солнечных лучей через стекло в первой части жизненного цикла	$t_{4I}$ (см. таблицу 5)	> 80
$t_{4T}$ (см. таблицу 5)	< 20			
<p>1) Относительное удлинение <math>R</math> определяют по формуле</p> $R = \frac{\epsilon_{br}}{\epsilon_{b0}} \cdot 100,$ <p>где <math>\epsilon_{br}</math> — остаточная деформация (или удлинение) при разрыве пленки, %;  <math>\epsilon_{b0}</math> — деформация (или удлинение) при разрыве пленки в исходном состоянии, %.</p>				

## 7 Метод оценки приобретенной биоразлагаемости

### 7.1 Общие положения

Оценку приобретенной биоразлагаемости проводят в соответствии с 7.3 для полимерного материала, который удовлетворяет требованиям абиотического разложения, указанным в разделе 6.

### 7.2 Меры предосторожности при проведении испытаний

Оборудование, используемое при испытаниях, подлежит стерилизации в автоклаве. Емкости для исследования следует открывать под стерильным боксом. Полимерный материал, используемый для испытания, стерилизуют, погружая его в 70 %-ный этиловый спирт и высушивают под стерильным боксом.

### 7.3 Испытание

#### 7.3.1 Подготовка образцов

За образец принимают не менее 100 мг окисленного полимерного материала (6.7), который достиг увеличения поглощения не менее  $3e/100$ , где  $e$  — толщина пленки, мк.

#### 7.3.2 Хранение окисленного полимерного материала

Частицы окисленного полимерного материала в период между окончанием термоокисления (6.7) и началом инкубации (7.3.4) хранят в стерильных емкостях при температуре  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

#### 7.3.3 Просеивание окисленного полимерного материала

Окисленный полимерный материал рекомендуется просеивать через металлическое сито с ячейкой размером примерно 1 мм, чтобы получить более однородные по размеру частицы для инкубации.

#### 7.3.4 Инкубация

##### 7.3.4.1 Культурная среда для инкубации

Инкубацию микроорганизмов проводят в водном растворе, в который добавлены следовые количества веществ, необходимых для роста микроорганизмов. Состав раствора приведен в таблице 8. Рекомендуется применять реактивы ч.д.а.

Таблица 8 — Состав инкубационной культурной среды

Соединение	Концентрация, г·л <sup>-1</sup>
Динатрия фосфат додекагидрат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3,8
Обезвоженный однозамещенный фосфорнокислый калий ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,8

Окончание таблицы 8

Соединение	Концентрация, г л <sup>-1</sup>
Магний сернокислый семиводный (MgSO <sub>4</sub> · 7 · H <sub>2</sub> O)	0,02
Аммоний-железо III сульфат, шестиводный (Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 · H <sub>2</sub> O)	0,03
Хлорид кальция, дигидрат (CaCl <sub>2</sub> · 2 · H <sub>2</sub> O)	0,01
Хлорид натрия (NaCl)	0,5
Хлорид аммония (NH <sub>4</sub> Cl)	0,3
Микроэлементы (1 мл на 100 мл воды в среде): сульфат марганца (MnSO <sub>4</sub> ) борная кислота (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) сульфат цинка семиводный (ZnSO <sub>4</sub> · 7 · H <sub>2</sub> O) молибдат натрия (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ) нитрат кобальта(II) Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> сульфат меди(II) (CuSO <sub>4</sub> )	4 · 10 <sup>-4</sup> 5,8 · 10 <sup>-5</sup> 4,4 · 10 <sup>-5</sup> 2 · 10 <sup>-3</sup> Следовые количества Следовые количества

#### 7.3.4.2 Бактериальный штамм

При инкубации используют бактериальный штамм «*Rhodococcus rhodochrous*».

#### 7.3.4.3 Процедура

Для подготовки к измерению концентраций АТФ инкубацию проводят в стеклянных склянках вместимостью 4 мл, которые герметично закрывают, чтобы предотвратить испарение культурной среды.

Объем воздуха, содержащийся в склянках, достаточен для снабжения кислородом бактериальной культуры в течение нескольких недель. Склянки открывают каждую неделю, чтобы обновить объем воздуха. Концентрация фрагментов полимерного материала в культурной среде установлена 5 мг · мл<sup>-1</sup> ± 5 % при концентрации бактерий примерно 10<sup>4</sup> клеток на 1 мл культурной среды.

Во избежание образования осадка частиц полимерного материала и оксигенации (обогащения кислородом) культурной среды необходимо при температуре (27 ± 0,1) °С, перемешивать их при постоянной скорости 120 об/мин.

Отбирают девять образцов, чтобы проследить изменения концентрации АТФ в культурной среде. Образцы должны быть взяты в начале испытания (день 0) и далее через 4 дня, 8 дней, 12 дней, 30 дней, 60 дней, 90 дней, 120 дней и 180 дней.

Для каждого образца используют контрольную склянку без полимерного материала в качестве эталона.

#### 7.3.5 Определение концентрации АТФ

Концентрацию АТФ первых восьми образцов измеряют, используя прилагаемый протокол.

Например, в протоколе для *Bio Thema «ATP Biomass Kit HS»*:

- используют 0,4 мл культурной среды;
- добавляют 0,4 мл экстрагента «extractant B/S» в наборе, который лизирует (разрушает) клетки, высвобождая содержимое клеток, и корректирует культурную среду, нейтрализуя активность энзимов;
- добавляют 100 мкл этой смеси в измерительную трубку люминометра;
- добавляют 400 мкл АТФ реагента *HS*;
- измеряют концентрацию  $I_{\text{smp}}$ ;
- добавляют 10 мкл стандартного раствора АТФ (1 пикомоль);
- измеряют концентрацию  $I_{\text{smp+std}}$ .

Для каждого образца измеряют концентрацию АТФ трех склянок.

Вычисляют концентрацию АТФ по формуле

$$\text{АТФ}_{\text{smp}} = \frac{I_{\text{smp}}}{I_{\text{smp+std}} - I_{\text{smp}}} X, \quad (1)$$

где  $\text{АТФ}_{\text{smp}}$  — концентрация АТФ, пмоль/мл;

$I_{\text{smp}}$  — концентрация, измеренная по перечислению д) протокола, пмоль/мл;

$I_{\text{smp+std}}$  — это концентрация, измеренная по перечислению ж) протокола, пмоль/мл;

$X$  — коэффициент разбавления исходного образца.

### 7.3.6 Определение жизнестойкости и концентрации АДФ через 180 дней

#### 7.3.6.1 Общая характеристика

Через 180 дней инкубации проводят следующие два испытания для каждой склянки, содержащей полимерный материал, а также для каждой контрольной склянки без полимерного материала:

а) распределяют 100 мкл культурной среды на питательном агаре (TS), чтобы проверить жизнестойкость бактериальных клеток, т.е. их способность к размножению в благоприятной среде после шести месяцев нахождения в культурной среде. Тест жизнестойкости считают положительным, если можно наблюдать колонии *Rhodococcus rhodochrous* через несколько дней выдерживания в термостате при температуре  $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;

б) измеряют концентрацию АДФ, чтобы вычислить отношение АДФ/АТФ. Это отношение позволяет оценить расход энергии бактерий, т.е. их «состояние истощения».

**Примечание** — Для функционирования биологической клетке необходимо преобразовывать питательные вещества, такие как, например, молекулы с углеродной цепью, в форму энергии, АТФ (7.3.5). Необходимая энергия для различных происходящих в клетке химических реакций высвобождается, когда АТФ гидрируется до менее энергетически насыщенных молекул, как АДФ (аденозиндифосфат) и АМФ (аденазинмонофосфат). Эти молекулы затем фосфорилируют (перерабатываются) в АТФ при поступлении свежих питательных веществ. Этот процесс является основным в клетке бактерии.

Далее измеряют концентрацию АТФ склянок, которые не содержат полимерного материала.

Измеряют концентрацию АТФ в трех склянках через 180 дней. Тесты жизнестойкости также проводят на этих трех склянках.

Протокол измерения концентрации АТФ и АДФ для конечного образца не такой, как указан в 7.3.6.3 и 7.3.6.4. Для определения концентрации АДФ в бактериях и культурной среде весь АДФ должен быть преобразован в АТФ.

После первого измерения концентрации АТФ весь АДФ преобразуют в АТФ для второго измерения АТФ. Далее определяют концентрацию АДФ, вычислив разницу двух измерений, и затем определяют отношение АДФ/АТФ.

#### 7.3.6.2 Растворы для анализа

Ниже приведены составы четырех водных растворов, необходимых для анализа концентрации АДФ, кроме разбавителя В, состав которого не разглашается.

7.3.6.2.1 Раствор 1. Разбавитель В+К+Mg состоит из 10 мл разбавителя В (из набора АТФ), 200 мкл 1М KCl и 10 мкл 1М MgSO<sub>4</sub>. Растворы KCl и MgSO<sub>4</sub> готовят в стерильной ультрачистой воде (7.3.6.2.2).

7.3.6.2.2 Раствор 2. PEP (фосфоенолпируват) состоит из 120 мг ФЭП и 5 мл 0,05 М буферного раствора Трис-HCl (гидроксиметил) гидрохлорида аминометана (pH 7,2), приготовленного из стерильной ультрачистой воды. Регулируют pH при помощи концентрированного раствора КОН.

7.3.6.2.3 Раствор 3. PEP+PK (фосфоенолпируваткиназа) состоит из 5 мг PK, растворенных в 1 мл раствора PEP; отбирают 200 мкл аликвоты и хранят при температуре минус 40 °С.

7.3.6.2.4 Раствор 4. АТФ реагент, АТФ реагент HS (сублимационная сушка), растворенный в 2,5 мл стерильной ультрачистой воды, не содержащей АТФ, вместо использования разбавителя В из набора АТФ санитария HS (*BioThema*) «ATP Biomass Kit HS».

#### 7.3.6.3 Определение концентрации АТФ

Измеряют концентрацию АТФ, следуя приведенному протоколу:

а) смешивают объем образца с таким же объемом экстрагента В/S;

б) добавляют в трубку люминометра:

- 30 мкл смеси образца/экстрагента В/S;

- 240 мкл разбавителя В+К+Mg (раствор 1);

- 20 мкл стерильной ультрачистой H<sub>2</sub>O, не содержащей АТФ;

в) закрывают трубку герметизирующей пленкой парафильм;

г) инкубируют смесь 10 мин при 37 °С;

д) добавляют 60 мкл АТФ реагента;

е) измеряют концентрацию  $I_{\text{смп},0}$ ;

ж) добавляют 10 мкл стандартного раствора АТФ (1 пикомоль);

и) измеряют концентрацию  $I_{\text{смп} + \text{std},0}$ .

Вычисляют концентрацию АТФ через 180 дней  $АТФ_{smp,0}$  по формуле

$$АТФ_{smp,0} = \frac{l_{smp,0}}{l_{smp+std,0} - l_{smp,0}} X_0, \quad (2)$$

где  $АТФ_{smp,0}$  — концентрация АТФ культурной среды, пмоль/мл;

$l_{smp,0}$  — концентрация, измеренная по перечислению д) протокола, пмоль/мл;

$l_{smp+std,0}$  — концентрация, измеренная по перечислению ж) протокола, пмоль/мл;

$X_0$  — коэффициент разбавления исходного образца.

#### 7.3.6.4 Определение концентрации АТФ + АДФ

Концентрацию АТФ + АДФ измеряют, следуя приведенному протоколу:

а) смешивают объем образца с таким же объемом экстрагента В/С;

б) добавляют в трубку люминометра:

- 30 мкл смеси образца/экстрагента В/С;

- 240 мкл разбавителя В+К+Мг (раствор 1);

- 10 мкл РЕР+РК (раствор 3);

- 10 мкл стерильной ультрачистой  $H_2O$ , не содержащей АТФ;

в) закрывают трубку герметизирующей пленкой парафильм;

г) инкубируют смесь 10 мин при температуре 37 °С;

д) добавляют 60 мкл АТФ реагента;

е) измеряют концентрацию  $l_{smp}$ ;

ж) добавляют 10 мкл стандартного раствора АТФ (1 пикомоль);

и) измеряют концентрацию  $l_{smp+std}$ .

Концентрацию АТФ вычисляют через 180 дней и преобразование АДФ в АТФ.

$АТФ_{smp,1}$  вычисляют по формуле

$$АТФ_{smp,1} = \frac{l_{smp,1}}{l_{smp+std,1} - l_{smp,1}} X_1, \quad (3)$$

где  $АТФ_{smp,1}$  — концентрация АТФ, пмоль/мл, после преобразования АДФ в АТФ;

$l_{smp,1}$  — концентрация, измеренная по перечислению д) протокола, пмоль/мл;

$l_{smp+std,1}$  — концентрация, измеренная по перечислению ж) протокола, пмоль/мл;

$X_1$  — коэффициент разбавления исходного образца.

#### 7.3.6.5 Определение концентрации АДФ и отношения АДФ/АТФ

Вычисляют концентрацию АДФ,  $АДФ_0$  через 180 дней и отношение АДФ/АТФ  $R$  также через 180 дней по формулам:

$$АДФ_0 = АТФ_{smp,1} - АТФ_{smp,0}; \quad (4)$$

$$R = \frac{АТФ_{smp,1} - АТФ_{smp,0}}{АТФ_{smp,0}}, \quad (5)$$

где  $АДФ_0$  — концентрация АДФ культурной среды, пмоль/мл;

$АТФ_{smp,1}$  — концентрация АТФ культурной среды, пмоль/мл, после преобразования АДФ в АТФ;

$АТФ_{smp,0}$  — концентрация АТФ культурной среды, пмоль/мл;

$R$  — отношение АДФ/АТФ культурной среды, безразмерное значение.

## 7.4 Требования

Испытуемый полимерный материал обладает приобретенной биоразлагаемостью, если удовлетворены следующие три условия:

а) концентрации АТФ в склянках, содержащих полимерный материал, должны стабилизироваться при значении, в 3 раза больше, чем значение, наблюдаемое в контрольных склянках, не содержащих полимерного материала, в период испытания между первым и шестым месяцами эксперимента.

**Примечание 1** — Это требование отражает тот факт, что бактерии используют окисленный полимер как питательное вещество;

б) отношение АДФ/АТФ должно быть  $\leq 3$  через 180 дней.

Примечание 2 — Это требование отражает тот факт, что энергетический уровень бактерий удовлетворительный;

в) результаты теста жизнестойкости, проведенного на полимерном материале после инкубационного периода 180 дней, должны быть положительными.

Примечание 3 — Это требование отражает тот факт, что полимерный материал не содержит элементов, токсичных штамму *Rhodococcus rhodochrous*.

## 8 Обработка результатов

Результаты испытаний оформляют протоколом, который должен содержать:

- а) ссылку на настоящий стандарт;
- б) информацию, необходимую для определения и характеристики испытываемой пленки, включая материал, толщину, происхождение и номер изделия;
- в) тип оксо-биоразлагаемого материала;
- г) тип пленки;
- д) метод оценки абиотического разложения: изменение поглощения или прочностных характеристик;
- е) характеристику камеры фотостарения и условия испытания;
- ж) результаты оценки абиотического разложения, включая:
  - увеличение поглощения после испытания термоокисления;
  - увеличение поглощения после испытания фотоокисления;
  - увеличение поглощения после испытания термоокисления предварительно окисленной пленки и/или в соответствующих случаях условия и результаты испытаний прочностных свойств, включая:
    - отношение остаточного удлинения при разрыве после термоокисления к удлинению при разрыве в исходном состоянии;
    - отношение остаточного удлинения при разрыве после фотоокисления к удлинению при разрыве в исходном состоянии;
- и) результаты испытания по оценке приобретенной биоразлагаемости, включая:
  - концентрацию АТФ,  $АТФ_{\text{сmp}}$  для всех восьми образцов (индивидуальные и среднее значения), определение АТФ — см. приложение А;
  - концентрацию АТФ,  $АТФ_{\text{сmp},0}$  для образцов через 180 дней (индивидуальные и среднее значения), примеры зависимости изменения концентрации АТФ от времени — см. приложение Б;
  - отношение  $R$ , АДФ/АТФ через 180 дней (индивидуальные и среднее значения);
  - природу и результаты испытания жизнеспособности (индивидуальные результаты);
- к) любые факторы, которые могут повлиять на результаты испытаний и другую информацию, не указанную в настоящем стандарте;
- л) дату проведения испытания.

Приложение А  
(справочное)

Определение АТФ

А.1 Энергия в живых клетках получается гидролизом АТФ до АДФ и/или до АМФ. Химическая формула АТФ:  $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ; структура молекулы представлена на рисунке А.1.

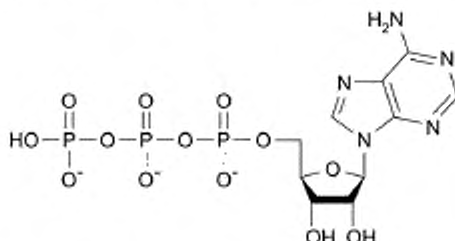
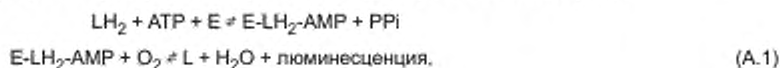


Рисунок А.1 — Молекулярное строение АТФ

А.2 В любой момент времени количество АТФ в клетке зависит от ее метаболической активности. Измерение АТФ — один из способов оценки количества активной микробной биомассы и уровня роста.

Измерение АТФ основано на реакции люциферина с люциферазой (получаемой от светляков), происходящей в присутствии АТФ. Во время этого процесса возникает свечение.

В оптимальных условиях получается 1 фотон на молекулу АТФ. Производимый свет измеряют с использованием чувствительного фотометра (или люминометра) и выражают в относительных световых единицах (*RLU*). Затем с использованием коэффициента преобразования рассчитывают содержание АТФ в образце.

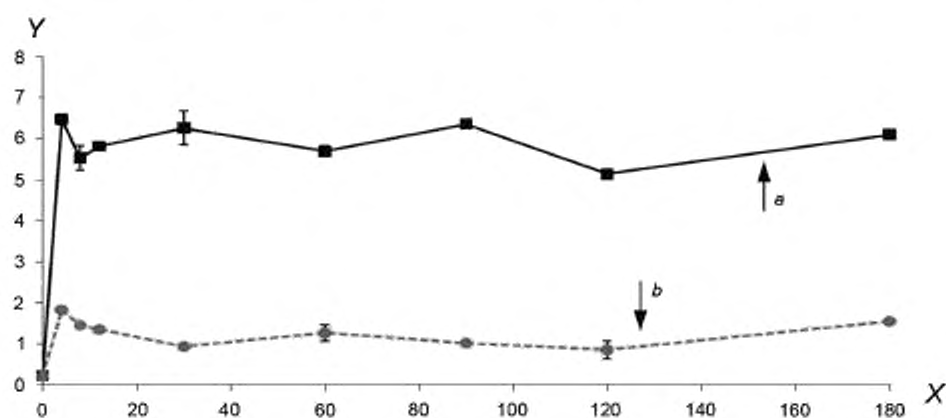


- где  $LH_2$  — люциферин;  
 АТФ — аденозинтрифосфат;  
 Е — люцифераза;  
 АМФ — аденозинмонофосфат;  
 PPi — пиррофосфат;  
 L — окслюциферин;  
 $H_2O$  — вода.



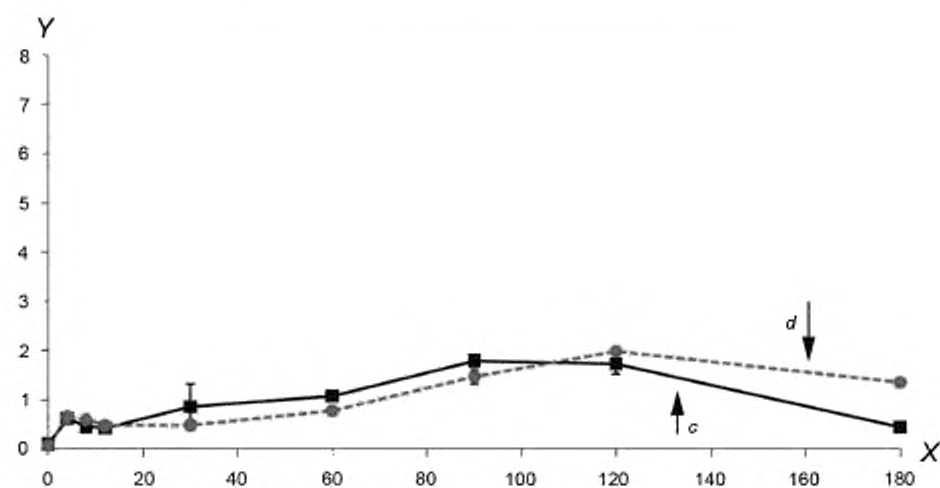
Приложение Б  
(справочное)

Примеры зависимости изменения концентрации АТФ от времени



X — продолжительность испытания, дни; Y — концентрация АТФ, пмоль/мл; a — пленка, предварительно подверженная фотоокислению и термоокислению при 60 °С, культурная среда с окисленными частицами; b — культурная среда без окисленных частиц (контрольная емкость для эксперимента)

Рисунок Б.1 — Биоразлагаемая полиэтиленовая пленка



X — продолжительность испытания, дни; Y — концентрация АТФ, пмоль/мл; c — пленка, предварительно подверженная фотоокислению и термоокислению при 60 °С, культурная среда с окисленными частицами; d — культурная среда без окисленных частиц (контрольная емкость для эксперимента)

Рисунок Б.2 — Небиоразлагаемый полиэтилен



### Библиография

- [1] ИСО 10640:2011 Пластмассы. Методология оценки степени фотостарения полимера с использованием FTIR\* и UV/видимой спектроскопии  
(ISO 10640:2011) (Plastics — Methodology for assessing polymer photoageing by FTIR and UV/visible spectroscopy)

---

\* FTIR: ИК Фурье-спектрофотометрия.

---

УДК 621.798:006.354

МКС 55.020

Ключевые слова: оксо-биоразлагаемая упаковка, методики оценки биоразлагаемости полимерных пленок, абиотическое разложение, классификация пленок, термоокисление, фотоокисление

---

**БЗ 10—2017/172**

Редактор *Л.И. Нахимова*  
Технический редактор *И.Е. Черепкова*  
Корректор *И.А. Королева*  
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 09.02.2018. Подписано в печать 13.02.2018. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10. Тираж 24 экз. Зак. 295.  
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Издано и отлечтано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)