
Verifiering av sterilisering i processen för materialåtervinning av plast



Rapportnummer: B2483

I samarbete med: Stiftelsen IVL och Trioworld Industrier AB

Författare: Mats Töpel, Omneya Osman, Alexandra Almasi, Kristin Geidenmark Olofsson, Emma Strömberg

Medel från: Stiftelsen IVL och Trioworld Industrier AB

Granskare: Dämien Johann Bolinius, IVL

Godkännare: Mona Olsson Öberg

ISBN: 978-91-7883-584-3

Fotograf: Alexandra Almasi, Kristin Geidenmark Olofsson

Förord

Projektet *Verifiering av sterilisering i LDPE regranuleringsprocess* finansierades av företaget Trioworld Industrier AB och Stiftelsen IVL och genomfördes under perioden från februari 2022 till december 2023 av IVL Svenska Miljöinstitutet AB (IVL).

Projektets mål har varit att utveckla en metod för att verifiera sterilisering av LDPE vid regranuleringsprocessen av engångsprodukter av plast från vården och att metoden på sikt ska kunna standardiseras och skapa nytta för allmänheten. Projektet bedöms vara banbrytande och har öppnat upp ett helt nytt forskningsfält genom tillämpning av molekylärbiologiska metod för kvantifiering av DNA-molekyler vid låga koncentrationer i en materialåtervinningsprocess. Det har dock visat sig mycket svårt att inom den tidsram och budget som fanns tillgänglig i detta projekt komma hela vägen fram till en robust och säker metod för att verifiera sterilisering vid regranulering. Detta projekt har däremot visat att det är möjligt att använda molekylära metoder för att detektera DNA i regranulerad plast samt att det finns en potential för att tillämpa denna metod vid verifiering av sterilisering. Den största utmaningen har visat sig vara att extrahera tillräckliga mängder DNA från den regranulerade plasten, för att säkert kunna kvantifiera effekten av steriliseringen. Mer forskning behövs därför för att ta fram en metod som kan standardiseras. Vi hoppas därför att resultaten i detta projekt kommer att leda vidare till ytterligare utveckling för att på sikt uppnå projektets ursprungliga mål.

Arbetet gjordes i dialog med olika svenska och internationella experter, samt en styrgrupp med medlemmar från IVL och Trioworld Industrier AB. IVL tackar alla som ställt upp och bidragit till projektet.

Göteborg 2023-12-15 Alexandra Almasi, projektledare

Sammanfattning

Den nationella plastkartläggningen¹ visade att år 2017 användes över 813 miljoner engångsprodukter av plast inom hälso- och sjukvården i Sverige. Den största delen av detta avfall hanteras genom förbränning, och för att minska den miljöpåverkan detta leder till har ett antal initiativ tagits för att inkludera materialet i slutna kretslopp, där plasten används i samma applikation på nytt och där materialets höga kvalitet kan behållas. För att kunna göra det på ett säkert sätt krävs dock att materialet kan steriliseras för att vara säkert att hantera.

Detta projekt har haft som mål att ta fram en metod för att mäta den eventuella steriliseringsprocess som sker när plast återvinns i den så kallade regranuleringsprocessen. Denna process innebär att plasten mals ner och smälts vid omkring 200°C. Om denna process är effektiv för att sterilisera materialet behövs inget separat steriliseringssteg innan regranuleringen.

Vi har i projektet tillsatt bakterien *Bacillus atrophaeus*, en organism som ofta används för verifiering av sterilisering, till regranuleringen av LDPE-plast. Vi har sedan utvärderat olika metoder för att extrahera DNA från det regranulerade materialet samt utvecklat en qPCR-metod för att kvantifiera antalet överlevande bakterier. På så sätt har vi försökt mäta den eventuella steriliseringen av det regranulerade plastmaterialet.

Resultatet visar att det fortfarande finns svårigheter att frigöra DNA-molekylerna från plasten, och att detta steg även kan ha en negativ påverkan på DNA-kvalitén. qPCR-metoden kan detektera *B. atrophaeus* och visar i ett separat värmeexperiment på en förväntad steriliseringseffekt över tid. Denna effekt kunde dock inte reproduceras i de labbförsök som utfördes med extruder (en utrustning som används för att pressa smält plastgranulat till den profil som önskas). Ett antal möjliga förklaringar till detta, samt förslag till vidare forskning presenteras avslutningsvis i rapporten. Exempel på fortsatta forskningsfrågor som presenteras är; fördelning av bakterier i plastmassan, inneslutande av celler i plastmaterialet, steriliseringseffekt i extrudern samt metod för bestrykning av bioindikator.

¹ SMED. 2019. Kartläggning av plastflöden i Sverige. Råvara, produkter, avfall och nedskräpning

Innehållsförteckning

Förord	3
Sammanfattning	4
1 Inledning	7
1.1 Problemställning	9
1.2 Syfte och mål	11
2 Metodutveckling	11
2.1 Extrudering och regranulering av plast	12
2.2 Kriterier för metodutvecklingen	12
2.3 Bioindikator för mätning av steriliseringseffekt	14
2.3.1 Identifiering av lämplig bioindikator	14
2.3.2 Identifiering av unik gen för bioindikatorn	16
2.4 Exponering av bioindikatorn för steriliseringseffekten i extrudern	16
2.5 Diskussioner med experter	17
3 Experimenten under steg 1	18
3.1 Testerna på Trioworld fabriker i Smålandsstenar och Ladskrona	18
3.1.1 Extruder test 1	18
3.1.2 Ugn test 1	19
3.1.3 Extruder test 2	19
3.1.4 Ugn test 2	20
3.2 Extraktion av DNA från plast	20
3.3 Analys av DNA med qPCR	21
3.4 Resultat från steg 1 och osäkerhetsfaktorer	22
4 Experimenten under steg 2	25
4.1 Tester för att öka mängden DNA som frigges från plast	25
4.2 Tester för att förbättra extraktionen av DNA från plast	27
5 Diskussion och förslag till vidare forskning	30
6 Litteraturförteckning	32

1 Inledning

Plast är ett material som används inom ett flertal applikationer i vården. Produkter som används är tillverkade av olika plastsorter som till exempel polyeten (PE), lågdensitetspolyeten (LDPE), polyvinylklorid (PVC) och polypropen (PP). Engångsprodukter i plast används inom vården för att minska risken för smitta samt för att klara hygienkraven.

Den nationella plastkartläggningen² visar att år 2017 användes det över 813 miljoner engångsprodukter av plast inom hälso- och sjukvården i Sverige. De vanligaste produkterna var:

- Handskar (358 miljoner)³
- Burkar, flaskor, bägare mm. (95 miljoner)
- Sprutor, kanyler (92 miljoner)
- Förkläden, skydd, jackor, mössor, skoöverdrag, skyddsglasögon (89 miljoner)
- Slangar, tillhörande påsar, kranar, ventiler, tuber, portar, adaptrar, munstycken, pumpar (79 miljoner).

Motsvarande mängd material i till exempel de handskar och engångsförkläden som har använts var cirka 2100 ton⁴ respektive 1900 ton⁵.

Med några få undantag, hanteras dessa plastprodukter från vården genom förbränning när de har blivit avfall⁶. Merparten av plasten går med annat avfall i slutna flöden till förbränning genom normal energiåtervinning och smittförande fraktioner går till högtemperaturdestruktion⁷. Detta innebär en stor klimatpåverkan eftersom den största delen av plasten är fossil-baserad nyråvara. Det finns därför en stor potential i att återvinna plast från vården och använda den i så kallade slutna kretslopp, där plastmaterialet används i samma applikation om och om igen för att behålla materialets höga kvalitet.

² SMED. 2019. Kartläggning av plastflöden i Sverige. Råvara, produkter, avfall och nedskräpning

³ Här ingår både handskar av PVC och nitrilgummi

⁴ SMED. 2019. Kartläggning av plastflöden i Sverige. Råvara, produkter, avfall och nedskräpning.

⁵ <https://www.naturvardsverket.se/amnesomraden/plast/hallbar-plastanvandning/plast-i-varden/#:-:text=V%C3%A5rden%20kan%20bidra%20till%20detta.av%20f%C3%B6rpackningar%20och%20andra%20produkter.>

⁶ SMED. 2019. Kartläggning av plastflöden i Sverige. Råvara, produkter, avfall och nedskräpning.

⁷ <https://www.naturvardsverket.se/4ac42e/globalassets/amnen/plast/dokument/slutrapport-vardens-plastavfall-far-nytt-liv.pdf>

Det pågår mycket diskussion mellan Sveriges regioner kring hur man når en mer hållbar plastanvändning inom vården. Både minskad användning och ökad materialåtervinning är relevanta frågor som regionerna vill arbeta med.

Det har genomförts flera pilotprojekt de senaste åren med syfte att utveckla bra logistik kring separat insamling av olika plastavfallsfraktioner från vården samt att studera kvalitén på den återvunna plasten. Två exempel på projekt är:

- *Sustainable management of plastic waste from hospitals*⁸ ;
- *Vårdens plastavfall får nytt liv*⁹.

Företaget Trioworld Landskrona AB har tillsammans med Danderyds Sjukhus gjort en pilotstudie som startade 2021 för att testa separat insamling och materialåtervinning i ett slutet kretslopp av plastförkläden tillverkade av LDPE plast¹⁰. Pilotstudien utökades även till Nya Karolinska i Solna, Södertälje sjukhus samt Folk tandvården Eastman och Vasastan. På sjukhusen valdes vissa avdelningar ut i piloterna men på Folk tandvårdens enheter var hela verksamheterna med. En viktig del i projektet har varit att sorteringen fungerar, då endast skyddskläder återvinns. I projektet har även en riskbedömning med tydliga instruktioner arbetas fram tillsammans med Smittskydd Region Stockholm för att säkerställa att inga smittförande skyddskläder kommer med i kretsloppet.

För att öka möjligheten att även kunna återvinna smittförande plastavfall undersöktes i projektet *Sustainable management of plastic waste from hospitals*¹¹ lämpliga konverteringsmetoder för att avlägsna infektionsrisker och om dessa metoder påverkade plasternas egenskaper och återvinningsbarhet. Resultatet var positivt och visade att de valda förbehandlingsprocesserna inte medför några mätbara förändringar i de studerade materialen, utom vissa indikationer på en mindre förlust av mjukgörare i PVC-proverna.

⁸ <https://www.ivl.se/download/18.20b707b7169f355daa77827/1561380939954/C391.pdf>

⁹ <https://www.vgregion.se/om-vgr/organisation-och-verksamhet/miljovgr/miljoplan-2017-2020/produkter-och-avfall/vardens-plastavfall-kan-bli-nya-forpackningar/#:~:text=Men%20d%C3%A5%20beh%C3%B6ver%20hanteringskedjor%20utvecklas.730%20000%20kr%20av%20Naturv%C3%A5rdsverket>.

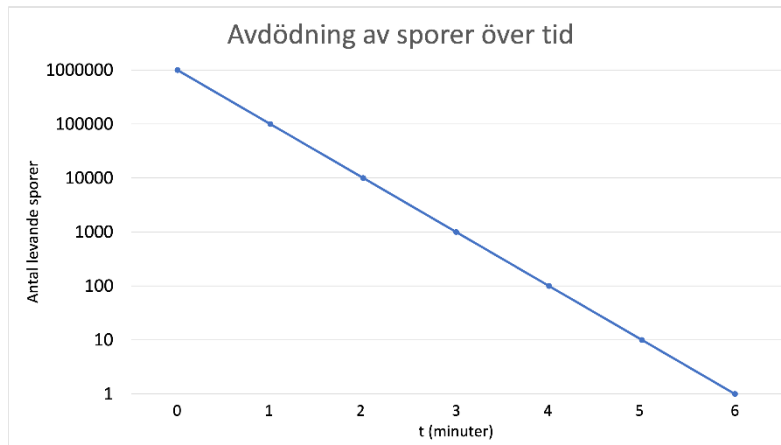
¹⁰ <https://sverigesradio.se/artikel/johannas-ide-bli-verklighet-sjukhuset-borjar-atervinna-forkladerna#:~:text=Johannas%20id%C3%A9%20blir%20verklighet%20E2%80%93%20sjukhuset%20b%C3%B6rjar%20%C3%A5tervinna%20f%C3%B6rkl%C3%A4den,-Lyssna%20fr%C3%A5n%20tidpunkt&text=I%20ett%20pilotprojekt%20p%C3%A5%20Danderyds,initiativ%20av%20intensiv%20v%C3%A5rds%20karen%20Johanna%20Albert>

¹¹ <https://ivl.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1549580&dswid=3377>

Denna rapport presenterar arbetet och resultatet från en studie genomförd av IVL i samarbete med Trioworld Industrier AB där målet varit att utveckla en metod för att mäta och verifiera en eventuell sterilisering som sker vid materialåtervinning genom regranulering av LDPE-plast. Utgångspunkten har varit att under själva processen för återvinning sker troligen en sterilisering eftersom temperaturer runt 190°C eller högre används för att smälta materialet, vilket är cirka 70°C högre än vad som används vid vanlig värmesterilisering. Dessutom används höga tryck och skjuvkrafter i denna process. Det har emellertid hitintills inte gjorts någon forskning som verifierat om det sker en sterilisering av möjliga patogener i denna process eller hur effektiv den är.

1.1 Problemställning

Studien byggde på antagandet att plast som genomgår materialåtervinning där plasten smältas ned igen och bearbetas i en extruder och regranuleras utsätts för en påverkan av värme, tryck och skjuvkrafter som är tillräckliga för att sterilisera materialet, och göra det säkert att använda i nya produkter. För att garantera produktsäkerheten krävs dock en metod som kan mäta denna eventuella steriliseringseffekt samt verifiera att det slutgiltiga materialet är fritt från eventuella patogener i form av bakterier och virus, den så kallade *bioload*, som steriliseringen avser att oskadliggöra. Detta kan göras genom att en känd mängd bakteriesporer (levande men inaktiva bakterier) tillsätts under steriliseringsprocessen och att antalet levande celler sedan mäts vid olika tidpunkter i processen, vilket illustreras i Figur 1. Grafen visar en optimal process där bakteriesporer bryts ner logaritmiskt över tid när de utsätts för en steriliseringsprocess. När processen startar finns en miljon levande celler och efter en minut har de reducerats med 90% till ett hundra tusen, och så vidare. Kurvan kan sedan användas för att räkna fram exponeringstiden som krävs för *Sterility Assurance Level* (SAL) vilket är sannolikheten att enbart 1 av 1 000 000 celler överlevt steriliseringen, och då materialet kan anses säkert att hantera.



Figur 1: Avdödning av sporer över tid under steriliseringsprocessen. Modifierad efter (Lerouge, 2019).

Traditionellt är de två processerna, tillverkning och sterilisering av plastprodukter som används för medicinska applikationer, separerade. Efter tillverkning förpackas produkten och steriliseras sedan i ett separat steg genom till exempel påverkan av värme, strålning eller gas. Effekten av steriliseringen mäts då genom att till exempel ett känt antal celler av en värmetålig bakterie, en så kallad bioindikator, inkluderas i steriliseringssteget, och antalet överlevande celler sedan mäts (Agalloco, 2017). För detta ändamål finns specifika standardiserade metoder som kan påvisa steriliseringseffekten genom att skifta färg, eller metoder där bakterier odlas i ett näringsmedium för att enklare kunna kvantifieras. Dessa metoder är dock inte ändamålsenliga vid extrudering av plast eftersom de tillsatta bakteriecellerna smälts in i plasten under materialåtervinningen genom omblandningen som sker i extrudern.

För att en mätning av steriliseringseffekten i processen för materialåtervinning av plast ska vara möjlig, behövs därför:

- en metod för att först frigöra celler av bioindikatorn från plasten på ett sätt som i processen inte dödar cellerna och leder till ett missvisande mätvärde;
- en metod som kan kvantifiera antalet överlevande celler av bioindikatorn vid olika tidpunkt, och därmed visa på den steriliserande effekt som värme och tryck i extrudern har haft, samt identifiera exponeringstiden som krävs för att nå SAL.

1.2 Syfte och mål

Syftet med denna tvärvetenskapliga studie har varit att ta fram ny kunskap och en metod för att verifiera steriliseringen av LDPE-plast under regranuleringsprocessen av engångsprodukter från vården. Detta för att kunna möjliggöra ett komplement till förbehandling av smittförande avfall för att öka materialåtervinningen av plast från hälso-och sjukvården.

Projektets mål var att:

- Identifiera en lämplig bioindikator för ändamålet;
- Utveckla en metod för att extrahera bioindikatorns DNA från regranulerad LDPE plast;
- Utveckla ett qPCR-protokoll för kvantifiering av bioindikatorns DNA som kan användas för att mäta och verifiera effekten av steriliseringsprocessen.
- Empiriskt testa steriliseringsprocessens effektivitet.

2 Metodutveckling

Användning av återvinningsprocessen som steriliseringsmetod är ett nytt forskningsfält. Projektet bedöms vara unik eftersom den kombinerar kunskap från flera olika områden, så som materialvetenskap, molekylärbiologi, bioinformatik, cirkulär ekonomi, samt tillverkning och materialåtervinning av plastprodukter. Inga liknande studier eller experiment har identifierats under projektets genomförande.

Utvecklingsprocessen skedde i två steg vid olika labb, där steg två baserades på resultat, identifierade utmaningar och kunskap samlad under första steget.

Det laborativa arbetet genomfördes av TATAA Biocenter i Göteborg och IVLs eget molekylärbiologiska laboratorium i Stockholm. TATAA Biocenter valdes i första hand som laboratorium att samarbeta med eftersom IVLs laboratorium inte hade all nödvändig utrustning för qPCR analys tillgänglig vid projektstart. Efter att utrusningen installerades på IVL genomfördes andra delen av arbetet där. Detta gav möjlighet till större flexibilitet angående antal och typ av försök som kunde genomföras, vilket i slutändan gynnade studien.

2.1 Extrudering och regranulering av plast

Projektet började med ett studiebesök på Trioworlds fabriker för tillverkning av förpackningar och produkter av LDPE plast i Smålandsstenar och Landskrona. Studiebesöket genomfördes i mars 2022 för att få en detaljerad förståelse för de förutsättningar som gäller vid extrudering samt den utrustning som fanns tillgänglig för användning i projektet. I Smålandsstenar blev projektgruppen visade en plastextruder i labbskala som skulle användas för att testa metoden (Figur 2).



Figur 2: Plastextruder i labbskala på Trioworld fabrik i Smålandsstenar som användes i studien.

I Landskrona besökte projektgruppen den storskaliga anläggning som används av Trioworld för att materialåtervinna olika fraktioner av LDPE plast. Vid denna anläggning fanns även den ugn som skulle användas i projektet för att ta fram referensproven att jämföra med proverna från extrudern.

I studien användes ny (ej återvunnet) icke-kontaminerat LDPE plastmaterial som utgör råmaterialet för engångsförkläden av plast. Som nyråvara valdes en LDPE för filmbåsning med densitet $0,923 \text{ g/cm}^3$ och smältindex MFR $0,75 \text{ [g/10] } 190^\circ\text{C}/2,16$ som används vid framställning av de engångsförkläden som Trioworld tillverkar och gärna vill kunna materialåtervinna i högre grad.

2.2 Kriterier för metodutvecklingen

Följande tre kriterier låg till grund för utvecklingen av en metod för att mäta steriliseringseffekter vid materialåtervinning av plast:

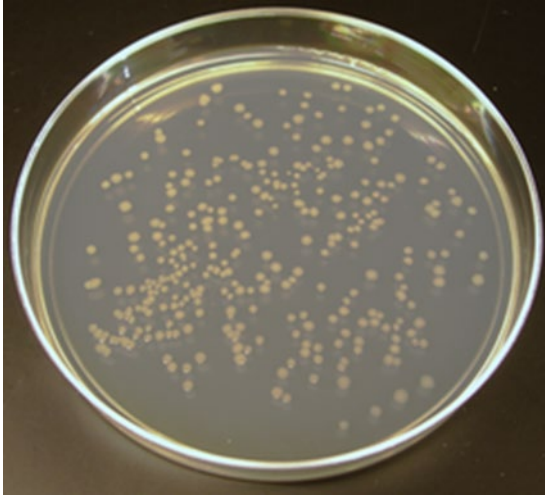
1. Metoden bygger på samma antaganden som vedertagna mätmetoder gör, där mätningen utgår från antalet celler som avdödas per tidsenhet, så som visas i Figur 1,
2. Den använder en välstuderad bioindikator, samt
3. Den minimerar eventuella mätfel som kan uppstå på grund av att överlevande celler är inneslutna i plast efter extruderingen.

För detta ändamål valdes utveckling av en molekylärbiologisk metod för DNA-extraktion från plast, samt en kvantifiering av DNA-molekyler med hjälp av quantitative polymerase chain reaction (qPCR) från den väletablerade bioindikatorn *Bacillus aetrophaeus*.

Fördelar med kvantifiering av DNA som metod

DNA är den molekyl som bär den genetiska kod som styr funktioner i celler. I en levande cell skyddas dessa molekyler bland annat genom olika processer som reparerar skador som kan uppstå naturligt eller genom påverkan från omgivningen. När bakterieceller dör upphör dessa processer att verka och DNA-molekylerna bryts då ner relativt snabbt när de utsätts för den omgivande miljön. Projektgruppen har därför utgått från att antalet DNA-molekyler som identifieras i ett prov som utsätts för en steriliseringsprocess, kan antas relativt väl motsvara antalet levande celler i provet.

En fördel med denna metod att uppskatta antalet levande celler jämfört med traditionella metoder, där cellerna kvantifieras efter att de odlats i eller på ett näringsmedium, är bland annat att den inte påverkas av cellernas fördelning i provet. Även vid mekanisk finfördelning av plasten kommer mycket små plastpartiklar kunna innehålla många celler vilket vid kvantifiering på näringsmedium, så som en agarplatta (Figur 3), kan leda till att flera överlevande celler ger upphov till en koloni (en koloni motsvarar normal en levande cell). Om flera celler klumpas samman och bildar en koloni så underskattas alltså antalet levande celler i provet. Detta i sin tur kan leda till en underskattning av antalet levande celler efter steriliseringsprocessen och därmed en överskattning av steriliseringens effektivitet.



Figur 3: Odling av bakterieceller på agarplatta. Ett agarmedium innehållande näringsämnen eller antibiotika som möjliggör artspecifik odling gjuts först i en petriskål. Mediet stryks sedan med en känd volym av en lösning innehållande bakterieceller av den sort som ska kvantifieras. Både döda och levande celler i lösningen sprids över ytan och de senare kommer börja dela på sig i kontakten med näringsmediet. Celldelningen leder efter en inkubationstid till att en koloni bildas för varje levande cell vilka sedan enkelt kan räknas med blotta ögat. Koncentrationen av levande celler, dvs. antal levande celler per volymenhet, kan därefter räknas fram (Bildkälla: Wikipedia).

Ytterligare en fördel med att mäta steriliseringseffekten med hjälp av kvantifiering av DNA-molekyler är att det finns välutvecklade metoder för att mäta även mycket små mängder DNA. I denna studie användes qPCR som metod för att mäta antalet överlevande celler genom att identifiera och kvantifiera en specifik variant av en gen som är unik för bioindikatorn.

2.3 Bioindikator för mätning av steriliseringseffekt

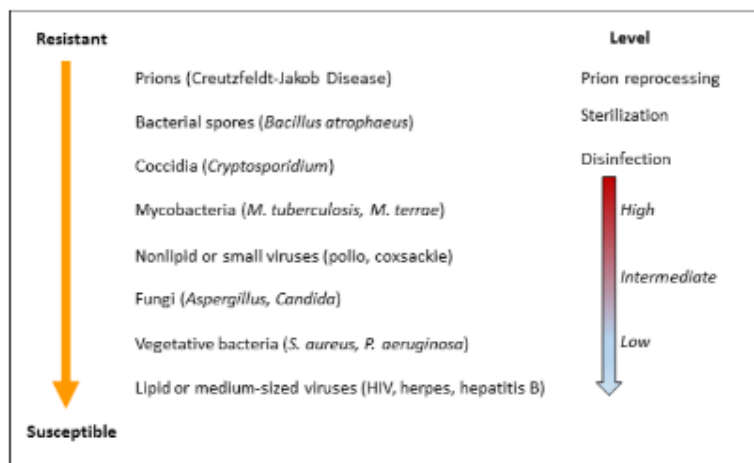
2.3.1 Identifiering av lämplig bioindikator

En litteraturstudie genomfördes för att identifiera en lämplig mikroorganism för att mäta effekten av steriliseringen på, kallad bioindikator. Kriterierna för att identifiera en lämplig bioindikator var att den:

- har en känd genomsekvens¹²,
- har en hög tålighet mot värme,
- är ofarlig att hantera på labb eller under planerade experiment,

Bakterien *Bacillus aetrophaeus* (*B. aetrophaeus*) identifierades som en lämplig bioindikator då denna organism uppfyller samtliga kriterier samt är frekvent använd för att mäta effekten av olika steriliseringsprocesser (Kempf, Schubert, & Beaudet, 2008), (Schubert & Beaudet, 2011). Bioindikatorn används inte i aktiv form för att testa steriliseringsprocesser. I stället används vilande sporer av bakterien som är inaktiva och som under rätt förutsättningar (temperatur, fuktighet, etc.) kan aktiveras.

Figur 4 illustrerar rangordningen av resistens hos mikroorganismer mot desinfektion och sterilisering, där *B. aetrophaeus* (andra uppifrån till vänster i listan) är bland de mest tåliga och därför ofta använd för mätning av sterilisering.



Figur 4: Rangordning av resistens hos mikroorganismer mot desinfektion och sterilisering (Källa: (Rutala, Weber, & HICPAC, 2019))

¹² Sekvensen av nukleotiderna Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) och Tymin (T) som utgör organismens DNA-molekyler. Genomsekvensen tas fram genom DNA-sekvensering och beskriver bland annat hur organismens samtliga gener ser ut.

2.3.2 Identifiering av unik gen för bioindikatorn

Som en del av metodutvecklingen har projektgruppen identifierat en artspecifik gen-sekvens hos *B. aetrophaeus* ATCC 9372 som använts för att utveckla ett qPCR-protokoll för att kvantifiera bioindikatorn och därmed mäta steriliseringseffekten på den. Detta för att säkerställa att detektionsmetoden identifierar en gen som bara förekommer i en kopia i genomet, samt är specifik för den genetiska variant av *B. aetrophaeus* som använts under projektet.

Denna gen identifierades genom att 3975 proteinsekvenser från helgenomssekvensen GCF_000742675 laddades ner från National Center for Biotechnology Information¹³. Med hjälp av programmet Blast (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) jämfördes sedan dessa med sekvenserna i NCBI nr-databasen (nerladdad 17:e maj 2022) för att identifiera gener specifika för *B. aetrophaeus*. Tjugoen sekvenser med få eller inga träffar mot andra arter identifierades i denna undersökning, och dessa jämfördes sedan med genomsekvensen för *B. aetrophaeus* ATCC 9372. Detta för att säkerställa att den markörgen som används i studien bara finns i en kopia i bakteriens genom, och att en detekterad genkopia därmed representerar en bakteriecell. Denna analys identifierade sekvensen WP_049774940.1 som uppfyller de krav som satts upp innan undersökningen, nämligen 1.) att genen ska vara unik för *B. aetrophaeus* samt 2.) bara förekomma i en kopia i dess genom.

2.4 Exponering av bioindikatorn för steriliseringseffekten i extrudern

En central fråga under utvecklingsprocessen var hur bioindikatorn skulle tillföras vid extruderingen samt hur temperatur- och tryckeffekter borde varieras för att en möjlig steriliseringseffekt skulle kunna påvisas. Utmaningen var att få tillräcklig stor skillnad i steriliseringseffekten för att skapa den typ av graf som exemplifieras i figur 1.

Under vanlig tillverkning av plastförkläden på fabriken, blandas ren ofärgat granulat av LDPE-plast med en viss mängd granulat som innehåller färg och olika

¹³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

tillsatser som behövs för att nå önskade egenskaper i slutprodukten. Plastgranulaten med färg och tillsatser kallas en *masterbatch*.

I projektet användes en masterbatch som specialtillverkades för experimenten och enbart innehöll färgpigment (blått) och bärare material (LDPE) för att minimera potentiellt störande tillsatser. Projektgruppen valde att bstryka plastgranuler från masterbatchen med bioindikatorn innan de tillsattes extrudern. Avsikten med användning av färgpigmenten i masterbatchen var att färgen skulle indikera när material innehållande bioindikatorn passerat genom extrudern. På så vis kunde uppehållstiden för bioindikatorn i extrudern lättare mätas. För bstrykning av masterbatchen användes 10 mL av *B. aetropheus* sporer i suspension. Koncentrationen var följande:

- Extruder och ugn test 1: 5×10^6 CFU¹⁴/mL
- Extruder och ugn test 2: 5×10^7 CFU/mL¹⁵.

Bakteriesporerna i suspension späddes med 40 mL PBS buffer (Fosfatbuffrad saltlösning) till en total volym av 50 mL. Till ett Falconrör innehållande 20 mL masterbatch tillsattes sedan 10 mL bakteriesuspension och blandningen rördes försiktigt om för att alla masterbatch granulerna skulle komma i kontakt med bakterierna.

Falconrören inkuberades sedan i en timme i rumstemperatur varefter plastgranulerna fördes över till ett metallkärl och torkades i 4.5 timmar vid 50 °C. Torkningen vid inkuberingen avsåg att få bakteriesporerna att fastna på plastmaterialet och därmed blir enklare att tillföra extruderingsprocessen.

2.5 Diskussioner med experter

Ämnet som projektet adresserar är högt innovativt och projektteamet har inte hittat någon indikation på att det finns tidigare forskning med liknande experiment att bygga vidare på. Projektgruppen kontaktade därför flera experter inom olika områden för att diskutera utmaningarna inom experimenten och möjliga lösningar.

Diskussionerna bidrog till en vidareutveckling av metoden samt en bekräftelse att antagandena gjorda vid utvecklingen av metoden samt det föreslagna

¹⁴ CFU betyder Colony-forming Unit

¹⁵ <https://se.vwr.com/store/product/en/26618477/biological-indicators-spore-suspensions>

experimentella upplägget var rimliga. Under samtalen konstaterades att utvärdering av sterilisering via extrudering av plastmaterial inte har genomförts tidigare och kommer att leda till ny kunskap för att främja materialåtervinning av plast, och eventuellt leda till att mer sjukvårdsmaterial kan användas i slutna kretslopp i framtiden. Dessutom påvisades intresse för att använda resultat från detta projekt för utveckling av en standardiserad metod att utvärdera sterilisering av plast via extrudering.

3 Experimenten under steg 1

Det experimentella arbetet i projektet genomfördes i två olika steg. Detta kapitel presenterar arbetet och resultat från experimenten gjorda under steg 1.

3.1 Testerna på Trioworlds fabriker i Smålandsstenar och Landskrona

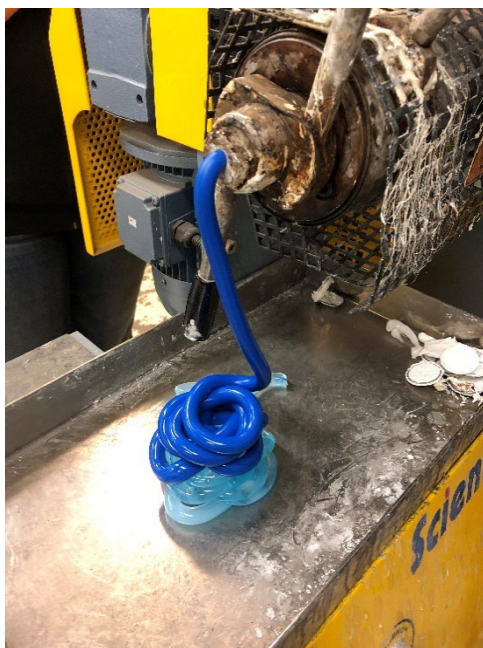
Under steg 1 genomförde projektgruppen vid två tillfällen försök med extrudern i labbskala vid Trioworlds fabrik i Smålandsstenar samt i ugn på Trioworlds fabrik i Landskrona.

3.1.1 Extruder test 1

Testet genomfördes den 4 mars 2022. Plastgranuler från masterbatch bestrukna med bioindikatorn bearbetades i extrudern vid fabriken i Smålandsstenar. Försöket genomfördes genom att först tillsätta ofärgad icke kontaminerad nyråvara i extrudern, därefter 15ml masterbatch granuler bestrukna med bioindikatorn, samt ytterligare ofärgad icke kontaminerad nyråvara. Tiden som bioindikatorn uppehöll sig i extrudern mättes fram till att den ofärgade extruderade plastmassan ändrade färg till blå (Figur 5), vilket indikerade att bioindikatorn passerat genom maskinen. Vid den tidpunkt togs plastprover av den blåa plasten. Proverna kylde på is direkt efter försöken för att så snabbt som möjligt avstanna värmeeffekten på bioindikatorn.

Vid testtillfället identifierade Trioworlds tekniker en högsta och en lägsta hastighet som kunde användas för extrudern under försöket. Detta resulterade i två olika uppehållstider för bioindikatorn i extrudern: 1 minut 56 sekunder och 2 min. 37

sekunder. Båda testerna utfördes i tre replikat, samtliga vid en temperatur av 190 °C. Sex prov samlades in från första testet i extrudern.



Figur 5: Den extruderade plastmassan består först helt av färglös nyråvara men ändrar färg när den tillsatta färgade masterbatchen bestruken med bioindikatorn passerat genom extrudern.

3.1.2 Ugn test 1

Vid fabriken i Landskrona genomfördes ett experiment där tre aluminiumformor med 5 ml masterbatch vardera placerades i en ugn vid 190 °C, under 2 minuter och 30 sekunder. Temperaturen motsvarar den i extrudern inställda processtemperaturen och tiden (så när som på 7 sekunder) motsvarar uppehållstiden i extrudern. Detta för att simulera extruderingsprocessens parametrar för temperatur och tid så nära som möjligt. Det som i övrigt skiljer mellan försöken i extrudern och ugnen är att i extrudern så utsätts plasten också för tryck och mekaniska krafter samt att bioindikatorn blandas in plasten.

Samtliga nio prover från test 1 (både från extruder och ugn) skickades till TATAA Biocenter för analys.

3.1.3 Extruder test 2

Resultat från test 1 visade mycket låga DNA-koncentrationer i de sex proven från extrudern, och i flera fall låg nivåerna under detektionsgränsen. Detta kan antas

bero på att den antagna steriliseringseffekten som sker under extruderingen redan dödat alla celler av bioindikatorn eller att utspädningseffekten som sker då den bestrukna masterbatchen tillsätts en jämförelsevis stor mängd nyråvara gör att antalet celler per volym plast blir väldigt låg.

Därför bestämde projektgruppen att upprepa experimenten, denna gång med masterbatch bestrukna med en högre koncentration av bioindikatorporer och under en kortare uppehållstid för masterbatchen i extrudern.

Test 2 genomfördes den 12 december 2022. Samma experiment som beskrivs i Extruder test 1 genomfördes i extrudern på Trioworld fabrik i Smålandsstenar med följande modifiering. Koncentrationen av bakterier som tillsatts masterbatchen var tio gånger högre, och uppehållstiden i extrudern kortades till 1 minut och 33 sekunder respektive 1 minut och 10 sekunder genom att extrudern kördes snabbare.

Den högre koncentrationen av bakterier samt den kortare uppehållstiden i extrudern användes för att öka sannolikheten att detektera fler bakterier, och därmed få ett säkrare mätresultat. Som första gången, kylde proverna av smält plast på is direkt efter försöken för att så snabbt som möjligt avstanna effekten av värme på bioindikatorn. Extrudertestet genomfördes i tre replikat.

3.1.4 Ugn test 2

Vid fabriken i Landskrona genomfördes ett nytt ugn-experiment, med samma två uppehållstider som använts i extruder-experiment 2. 5 ml masterbatch placerades i fem aluminiumformor som placerades i en ugn värmd till 190 °C under 1 minut och 10 sekunder (tre av de fem replikaten) samt 1 minut och 33 sekunder (resterande två replikat). Detta för att simulera extruderingsprocessens parametrar vid två olika hastigheter. Det i ugn smälta materialet kylades med is efter försöken.

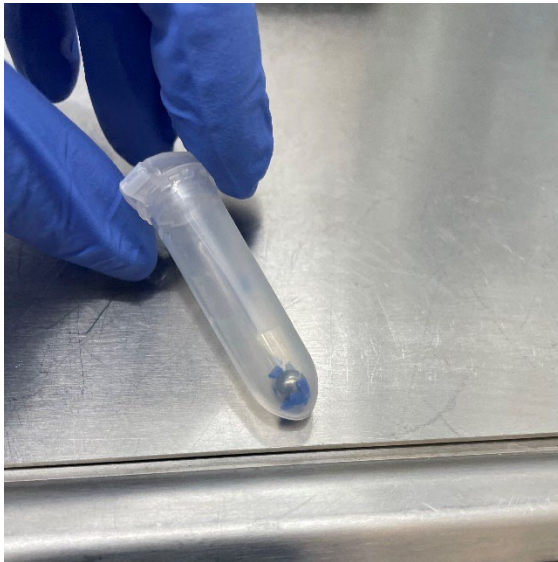
Från testomgång 2 har elva prov tagits fram och dessa har sedan analyserats av TATTA Biocenter.

3.2 Extraktion av DNA från plast

TATAA Biocenter i Göteborg tog initialt fram en metod fram för att extrahera DNA från plast. Metoden ingår i *QIAamp DNA Investigator kit* (Qiagen) och är en

modifierad version av protokollet *Isolation of Total DNA from Cigarette Butts*.¹⁶ Denna typ av protokoll används i forensiska undersökningar för extraktion av DNA från komplexa prov med små mängder DNA.

Innan DNA-extraktionen bearbetades material från samtliga prover i en Tissuelyser II (Qiagen) där plasten skakades tillsammans med stålkulor i 2 x 2 minuter [25 Hz] vilket resulterade i att delar av plasten pulveriserades (figur 6). Från detta pulver lyserades eventuella celler i materialet (vilket innebär att cellväggen förstörs med en buffert så att DNA frigörs) varefter DNA extraherades.



Figur 6: Plastgranuler från masterbatch som delvis pulveriserats genom skakning tillsammans med en stålkula.

3.3 Analys av DNA med qPCR

TATAA Biocenter designade en qPCR-metod för att detektera den artspecifika gensekvens som identifierats av IVL, där en 96 baspar (bp) lång del av genen amplifieras med en 5' FAM fluorofor. Känsligheten av metoden utvärderades med en spädningsserie mellan 20 och 2×10^7 kopior av gBlock™ per reaktion. Ett 16 stegs spädningsexperiment med 12 replikat per steg genomfördes för att bestämma metodens *Limit of Detection* (LOD). Denna gräns definieras som den lägsta koncentrationen i en spädningsserie där DNA kan detekteras i 95% av reaktionerna (det vill säga mindre än 5% falska negativa resultat). LOD för metoden framtagen i

¹⁶ <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=26ef8f2c-7c2a-49e6-b2d2-39d4e130b3cc&lang=en>

detta projekt fastställdes till 11 kopior vilket betyder att metoden med 95% säkerhet kan detektera DNA till denna mängd. *Limit of Quantification* (LOQ) dvs. gränsen där även antalet molekyler med säkerhet kan kvantifieras fastställdes till 17 kopior.

3.4 Resultat från steg 1 och osäkerhetsfaktorer

Detta underkapitel presenterar resultat från analyserna genomförda av TATAA Biocenter. Resultat från samtliga 20 prov från testerna 1 och 2 genomförda hos Trioworld och som analyserats av TATAA Biocenter presenteras i Tabell 1.

Tabell 1: Resultat från 20 prov analyserade av TATAA Biocenter. Kolumnen Tid anger uppehållstiden för proverna i antingen extrudern eller ugn. Testtillfälle visar vilka prov som togs under test 1 respektive 2. Replikat 1 och 2 anger antalet DNA-molekyler som detekterats med qPCR. Notera att bakteriekoncentrationen som tillsattes var 10 gånger högre vid testtillfälle 2. ND (No Data) anger att ingen signal kunde detekteras, och siffror i rött indikerar mätvärden under Level of Detection (LOD = 11 kopior) och Level of Quantification (LOQ = 17 kopior).

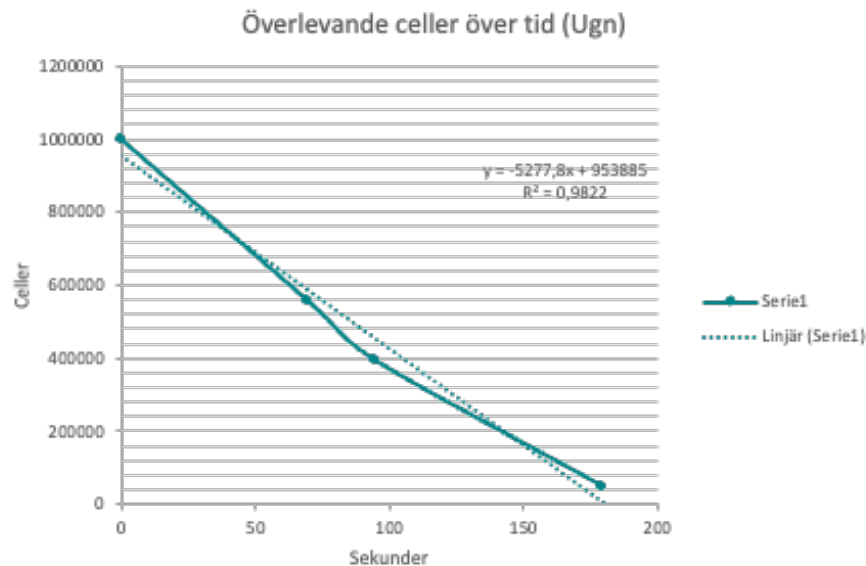
Prov	Testtillfälle	Tid (s.)	Extruder / Ugn	Replikat 1	Replikat 2
1A	1	118	E	ND	ND
1B	1	115	E	1.5	ND
1C	1	110	E	3.3	4.1
1D	1	157	E	1.9	ND
1E	1	157	E	1.5	ND
1F	1	157	E	ND	ND
2G-1	1	150	U	1 442	1 272
2G-2	1	150	U	1 527	1 264
2G-3	1	150	U	1 525	1 243
3A	2	95	E	0.6	ND
3B	2	92	E	1.4	3.1
3C	2	92	E	ND	ND
3D	2	70	E	ND	ND
3E	2	70	E	ND	3.5
3F	2	74	E	ND	ND
4A	2	70	U	14 720	20 873
4B	2	70	U	21 295	24 458
4C	2	70	U	19 305	19 467
4D	2	93	U	7 249	7 795
4E	2	93	U	20 287	20 746

Kartläggning av osäkerhetsfaktorer i testerna med extruder

Vid extruder-försöken laddades maskinen först med färglös nyråvara varefter de blå masterbatchen tillsattes. Detta innebär att de tillsatta bakterierna fördelades i en stor volym ren icke kontaminerad plast, vilket vid en jämn fördelning av bakterier innebär att det finns färre bakterier per volymenhet plast, det vill säga att bakteriesporerna späds ut i den totala plastmassa som finns i extrudern vid experimenten. Denna utspädningseffekt minskar detektionssignalen i qPCR-analysen och kan inte enkelt skiljas från en eventuell steriliseringseffekt som sker under extruderförsöken.

Vid ungsförsöken placerades bestrukna masterbatch-granuler i en aluminiumform direkt i ugnen utan att blandas med något annat material. Detta användes som referensexperiment eftersom det inte medför någon utspädning av bioindikatorn. En minskning av detekterade bakterier från dessa prover antas därför bero på en avdödning av bakterierna på grund av värmebehandlingen. Materialet bearbetades heller inte vilket innebär att bakterierna efter försöken förväntas finnas på ytan av materialet, inte inkaplade i materialet, vilket möjliggör att fler celler kan detekteras.

Resultateten från testerna i ugn verifierar att qPCR-metoden kan detektera bioindikatorn, samt att det sker en avdödning som är proportionerlig mot uppehållstiden i ugnen. Figur 7 illustrerar resultateten från testerna i ugn som också presenteras i Tabell 1. Då dessa experiment inte inneburit en omblandning av masterbatch-granulerna med nyråvara, är detektionsnivåerna högre än från extruderförsöken.



Figur 7: Regressionsanalys av normaliserade detektionsvärden från ugnsförsöken. Experimenten utfördes vid en temperatur av 190 °C (samma som extruderns processtemperatur) och proverna behandlades under lika lång tid som proverna från extrudern. Det höga R^2 -värdet (nära 1.0) visar att det finns en stark linjär korrelation mellan antalet detekterade kopior av bioindikatorns DNA och uppehållstiden i ugnen. En mätbar avdödning av bioindikatorn sker alltså i ugnen vid den temperatur och under den tid som extruderförsöket utfördes under.

De låga DNA nivåerna som detekteras i proven från testerna i extrudern kan ha flera orsaker, till exempel:

- 1.) Att för låga mängder bakteriesporer tillsatts i provet vid testerna, det vill säga att utspädningseffekten är för stor och sporerne sprids för mycket i plastmassan.
- 2.) Att behandlingstiden i extrudern är för lång, det vill säga att steriliseringseffekten är för hög för att vi ska hinna mäta den. Detta kan t.ex. bero på att trycket och skjuvkrafterna kraftigt bidrar till en sterilisering i extrudern men saknas i ugnen. Optimalt vore att ta ett prov tidigt i processen, ett prov väldigt sent samt ett antal prov där emellan, och med dessa data beskriva hur avdödningen av celler förändras med uppehållstiden i extrudern. Eftersom extrudern bara kan köras i ett visst hastighetsspann, var projektgruppen begränsade i den spridning av provpunkter som kunde åstadkommas.
- 3.) Att DNA-extraktionsmetoden behöver förbättras, t.ex. genom att effektivare frigöra bakterieceller som inkapslats i plasten under extruderingen.
- 4.) Att bstrykningen av masterbatchgranulaten inte är tillräckligt effektiv, och att inte förväntad mängd av bioindikatorn tillsätts processen under experimenten.

Baserad på dessa osäkerhetsfaktorer identifierades behovet av fler tester för att förstå vilken eller vilka av dessa som framför allt orsakar de låga detektionsnivåerna i proverna från extrudern. På grund av budget- och tidsbegränsningar i projektet, var det dock inte möjligt att genomföra flera tester kopplade till samtliga punkter. I dialog med projektets styrgrupp, fokuserade projektgruppen på IVL det fortsatta arbetet (steg 2 i studien) på att förbättra extraktionen och analysen av DNA från de existerande extruder-proverna.

4 Experimenten under steg 2

Osäkerheterna som identifierades under studiens första steg, samt kunskapen som då samlades in låg till grund för planering av experimenten under studiens andra steg. I detta kapitel presenteras experimenten som genomfördes på IVLs laboratorium i Stockholm.

De 20 plastproverna från steg 1 hämtades från TATAA Biocenter i Göteborg och transporterades till IVL i Stockholm.

4.1 Tester för att öka mängden DNA som frigges från plast

Flera olika tester för att förbättra metoden att extrahera DNA från plastproverna genomfördes på IVLs laboratorium. Försöken inriktade sig på att finfördela eller lösa upp plasten, både kemiskt och/eller mekanisk, med avsikt att öka mängden DNA som frigavs från plastproverna.

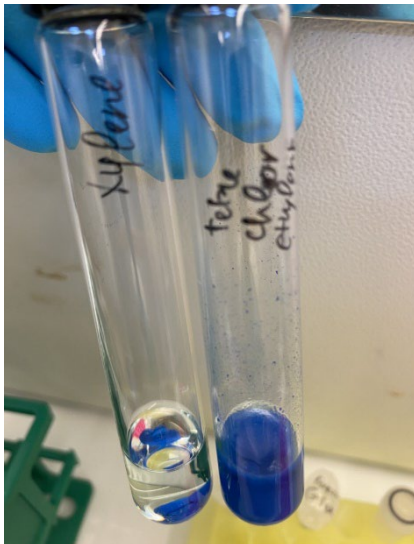
Först gjordes ett test för att kemiskt lösa upp plasten innan DNA-extraktionen. Vid detta arbete testades följande kemikalier för att identifiera vilken kan mest effektivt lösa upp LDPE-plasten:

- kloroform,
- diklormetan
- aceton
- P-xylol,
- xylen,

- etylbensen,
- triklorbensen
- tetrakloretylen

Testet genomfördes genom att 3-5 plastgranuler (utan bioindikator) placerades i sex separata rör och behandlades med de olika kemikalierna vid 50-90 °C i 1-5 timmar för att avgöra vilken av dem som hade snabbast och bäst effekt.

Tetrakloretylen gav i detta experiment bäst resultat och lyckades helt lösa upp plasten efter värmning till 90 °C i en timme (Figur 8).



Figur 8: Resultatet visar att Xylen (vänstra röret) inte lyckas lösa LDPE granulerna som syns som blå klumpar på botten av röret. I det högra röret med tetrakloretylen har granulerna helt lösts upp.

Samtliga kemikalier testades även i en homogeniserings-process där plast, lösningsmedel samt stålkulor skakades tillsammans för att på så vis snabbare lösa upp plasten. Denna metod gav dock inget förbättrat resultat och övergavs.

För att utvärdera lösningsmedlens eventuella nedbrytande effekt på DNA-molekylerna i provet så tillsattes referens-DNA från *B. aetnophaeus* samt DNA från amfibier till den upplösta plasten. Extraktion från detta material visade på låga koncentrationer av DNA vilket indikerar att lösningsmedlet hade en nedbrytande effekt på DNA molekyler.

En metod för att frigöra DNA från plasten genom att upprepade gånger frysa och tina materialet innan DNA-extraktion genomfördes också, men gav inget förbättrat resultat jämfört med den ursprungliga metoden framtagen av TATAA Biocenter.

4.2 Tester för att förbättra extraktionen av DNA från plast

För att förbättra extraktionen av DNA från plast, utvärderade IVL ytterligare tre extraktionsmetoder i tillägg till den som användes av TATAA Biocenter (som beskrivs under sektion 3.2). IVL testade tre DNA extraktions kits som är anpassade till extraktion av DNA från mikroorganismer, till skillnad från den som användes av TATAA Biocenter som var anpassad till extraktion av mycket små mängder av mänsklig DNA från forensiska prover.

Testet baserades på att LDPE-granuler inkuberades i rumstemperatur i en suspension av *B. aetrophaeus* sporer över natten. DNA-extraktion från detta material utfördes sedan med följande tre extraktionskit:

- DNeasy UltraClean Microbial Kit (Cat.12224-50),
- Qiagen Puregene Kit (Cat.158063),
- QIAamp DNA Microbiome kit (Cat. 51704).

Resultatet kvantifierades med en Qubit Flex fluorometer, Quant-iT High-Sensitivity dsDNA Assay Kit (Thermofisher). De tre extraktionsmetoderna testades även på material från testerna i extruder och från ugn, båda innehållande bioindikatorn. Tabell 2 visar resultat från dessa tester. Qiagen Puregene Kit gav bäst resultat och användes därför i fortsatta undersökningar.

Tabell 2: Resultatet av DNA-extraktion från tre olika extraktionsmetoder jämförda med den ursprungliga metoden framtagna av TATAA Biocenter. Koncentrationen angiven för metoden QIAamp DNA Investigator kit är ett medelvärde från extraktion från de tre replikaten G1-G3 och mättes bara med Nanophotometer, och inte med den mer känsliga Qubit metoden. I TATAAs experiment finns även RNA tillsatt vilket gör att resultaten inte är direkt jämförbara med resultaten från IVL's labb. Av speciellt intresse är kolumnen som anger 260/280-kvoten (provets absorptions av ljus med våglängderna 260 och 280 nm) där ett värde över 1.8 eftersträvas och indikerar provets renhet.

Extraktionskit	Laboratorium	Extraherat material	Nanophotometer (ng/ul)	260/280	Qubit (ng/ul)
DNeasy UltraClean Microbial Kit	IVL	20 pellets of G1	0.8	1	0.037
Qiagen Puregene Kit	IVL	20 pellets of G2	0.7	1.666	0.0323
QIAamp DNA Microbiome kit	IVL	20 pellets of G3	7	2.69	0.0128
QIAamp DNA Investigator kit	TATAA	G1, G2 och G3	41,0	3.89 - 4.29*	-

* Det höga värdet är troligen en effekt av att RNA tillsatts provet.

DNA extraherades sedan ur proverna från extruderförsöken och analyserades med qPCR för att avgöra om den nya extraktionsmetoden kunde förbättra detektionsgraden. I tabell 3 visas resultatet sida vid sida med de tidigare resultaten framtagna av TATAA. En intressant detalj i tabellen är jämförelsen mellan DNA-koncentrationerna för plast som bara behandlats med extraktionsbuffert, jämfört med plast som lösts med tetrakloretylen. I de flesta fall är koncentrationerna mer än dubbelt så höga i extraktionerna från den upplösta plasten jämfört med den traditionella metoden där enbart extraktionsbuffert använts vilket illustrerar att det är värt att fortsätta utveckla metoden för att lösa upp plasten. Trots detta visar qPCR resultatet att detektionsnivåerna fortfarande är för låga för att säkert kunna tolkas (tabell 3).

Tabell 3: Resultatet av olika DNA-extraktioner från plast och buffert (indikerat med provnamn 1A, 1B osv.) samt plast och lösningsmedlet Tetrakloretylen (1A-PER, 1B-PER osv.). Värden från TATAAs analys är uppmätta med Nanodrop, och från IVL med den mer känsliga Qubit-metoden. För de olika replikaten anges antalet detekterade genkopior som qPCR-analysen visade.

Namn prov	TATAA			IVL			
	DNA-koncentration (ng/μl)*	Replikat 1	Replikat 2	DNA-koncentration (ng/μl)	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
Kontroll1	16.70	39593.1	34619.4	0.04	60.3	51.7	56.8
Kontroll1-PER		-	-	0.09	-	-	-
1A	29.3	-	-	0.04	-	-	-
1A-PER		-	-	0.09	-	-	-
1B	25.8	1.5	-	0.03	-	-	-
1B-PER			-	0.08	0.005	-	-
1C	23.1	3.3	4.1	0.06	-	-	-
1C-PER		-	-	0.12	-	-	-
1D	32	1.9	-	0.19	-	-	-
1D-PER		-	-	0.03	-	-	-
1E	27.4	1.5	-	0.02	-	-	-
1E-PER		-	-	0.02	-	-	-
1F	35.5	-	-	0.05	-	-	-
1F-PER		-	-	0.02	-	-	-
3A	35.2	0.6	ND	0.01	0.003	0.006	-
3A-PER		-		0.03	-	-	-
3B	38.9	1.4	3.1	0.03	-	-	-
3B-PER		-		0.002	-	-	-
3C	42.4	-	-	0.03	-	-	-
3C-PER		-	-	0.04	-	-	-
3D	46.3	-	-	0.03	-	-	-
3D-PER		-	-	0.04	-	-	-
3E	37.3	-	3.5	0.06	-	-	-
3E-PER		-	-	0.18	-	-	-
3F	32.6	-	-	0.04	-	-	0.00005
3F-PER		-	-	0.008	-	-	0.0007

* Det höga koncentrationerna är troligen en effekt av att RNA tillsatts provet.

5 Diskussion och förslag till vidare forskning

Projektet nådde inte hela väggen fram till sitt ursprungliga mål att utveckla och demonstrera en metod för att verifiera sterilisering av LDPE-plast under återvinningsprocessen. Detta på grund av att vägen till en robust metod har visat sig vara mer komplicerad än vad projektgruppen först föreställt sig och planerat för.

Dock utvecklade och testade projektet en experimentdesign som möjliggör exponering av en bioindikator för den antagna steriliseringseffekten av en materialåtervinningsprocess för plast, även om den behöver testas och utvecklas vidare. Projektet har också utvecklat och testat flera metoder för att frigöra, extrahera och analysera små mängder DNA från plast. Ytterligare möjliggjorde projektet att flera experter inom fält som inte annars överlappar kunde samarbeta och skapa ny kunskap inom ett nytt forskningsfält. Inte minst, gav projektet möjlighet att kommunicera om arbetet och dess resultat, och förhoppningsvis kommer denna rapport att inspirera fler initiativ och studier som bygger vidare på detta arbete. Projektet gav värdefulla resultat som kan och bör byggas vidare på för att nå hela vägen till en metod för att verifiera steriliseringseffekten av en materialåtervinningsprocess för plast. I detta kapitel diskuteras behovet och möjligheterna för vidare forskning.

Många av de osäkerheter som identifierades under projektets gång har undersökts vidare och i flera fall har en lösning identifierats och applicerats. Trots detta finns det fortfarande utrymme för förbättring.

Projektgruppen har identifierat ett antal möjliga orsaker till den låga DNA-signalen som identifieras från extruder-proverna och presenterar några förslag till vidare experiment:

Det är en ojämn fördelning av bakterier i plastmassan

Detta fenomen kan verifieras eller förkastas genom att fler prover tas vid varje extruder-experiment. Detta har inte gjorts i detta projekt då budget saknades för ytterligare experiment med extrudern och det dessutom skulle kräva fler labbanalyser. Från observationer vid provtillfällena drar projektgruppen slutsatsen att detta fenomen troligen har en försumbar effekt på resultatet, men detta bör verifieras i ett uppföljningsprojekt.

Överlevande celler av bioindikatorn är inneslutna i plasten och DNA från dessa extraheras därför inte

Extraktionen av DNA från vissa typer av material kan misslyckas eller försvåras på grund av att materialet innehåller ämnen som påverkar reaktionerna i processen negativt. Lyckade försök gjordes dock där plasten först löstes upp med kemikalier, och från denna lösning kunde sedan DNA extraheras. För att uppskatta kemikaliernas eventuella negativa effekt på DNA-kvaliteten tillsattes även referens-DNA till lösningen. Experimentet resulterade i en oväntat låg koncentration av DNA vilket indikerar att kemikalierna har en negativ effekt på mängden DNA som kan extraheras. Detta kan till exempel bero på att molekylerna bryts ner eller binder till något i processen. Metoden för att lösa upp plasten, och därmed frigöra fler celler av bioindikatorn i DNA-extraktionen, kan alltså ha en motsatt effekt genom att samtidigt bryta ner DNA. Fler analyser bör därför genomföras för att ytterligare identifiera lösningsmedlets effekt på DNA-molekylerna, och reaktionerna som ingår i DNA-extraktionen. Alternativa metoder såsom ultraljudsonikering eller homogenisering med sand eller andra typer av material än glas- och stålkulor bör också undersökas, vilket kan ersätta den kemikaliska metoden för att frigöra bioindikatorn.

Steriliseringseffekten i extrudern är så snabb att det är svårt att hinna detektera, och därmed mäta den, under det tidsspänn som experimentet genomförs

Detta kan bero på att i jämförelse med experimenten i ugnen som gjordes under projektet, så utsätts bioindikatorn även för ett ökat tryck och skjuvkrafter under extruderingen. Detta kan göra att steriliseringen blir mycket mer effektiv. För att kunna utveckla en metod för att mäta sterilisering av plast behöver man kunna visa hur antalet celler som överlever i processen avtar över tid för att kunna ta fram en så kallad regressionskurva som beskriver steriliseringseffekten. Den extruder i labb-skala som används i experimenten under steg 1 kan inte köras snabbare än den kördes under studien och kortaste uppehållstid i extrudern som projektteamet lyckats åstadkomma var 1 minut och 10 sekunder.

Metoden för bestrykning av bioindikatorn på masterbatchgranulaten skulle kunna utvecklas

Detta dels för att försäkra att rätt mängd av bioindikatorn tillsätts experimenten, dels för att kunna skala upp experimenten och i slutändan utveckla en kommersiell tillämpning. Initialt bör till exempel en plastfilm av LDPE som omsluter granulat och suspension av bioindikatorn kunna användas, men även framställningen av en kapsel av lämplig storlek bör övervägas.

6 Litteraturförteckning

- Agalloco, J. P. (2017). Kill the Bioburden, Not the Biological Indicator. *BioPharm International*, 50–52.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol., PubMed*, 215:403-410.
- Kempf, M. J., Schubert, W. W., & Beaudet, R. A. (2008). Determination of lethality rate constants and D-values for *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) spores exposed to dry heat from 115 degrees C to 170 degrees C. *Astrobiology*, 8(6):1169-82.
- Lerouge, D. (2019). Sterilization and cleaning of metallic biomaterials. *Metals for Biomedical Devices*, 405-428.
- Rutala, W., Weber, D., & HICPAC. (2019). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*. Centres for Disease Control and Prevention.
- Schubert, W. W., & Beaudet, R. A. (2011). Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant *Bacillus* spores ATCC 29669 exposed to dry heat from 125°C to 200°C. *Astrobiology*, 11(3):213-23.

STOCKHOLM

Box 21060, 100 31 Stockholm

GÖTEBORG

Box 53021, 400 14 Göteborg

MALMÖ

Nordenskiöldsgatan 24
211 19 Malmö

KRISTINEBERG

**(Center för marin forskning
och innovation)**

Kristineberg 566
451 78 Fiskebäckskil

SKELLEFTEÅ

Kanalgatan 59
931 32 Skellefteå

BEIJING, CHINA

Room 612A
InterChina Commercial Building No.33
Dengshikou Dajie
Dongcheng District
Beijing 100006
China

© IVL SVENSKA MILJÖINSTITUTET AB | Tel: 010-788 65 00 | www.ivl.se