

DIN EN 17181

ICS 75.100

Einsprüche bis 2017-12-27

Entwurf**Schmieröle –****Bestimmung des aeroben biologischen Abbaus von vollständig formulierten Schmierstoffen in wässriger Lösung –****Prüfverfahren mittels CO₂-Produktion;****Deutsche und Englische Fassung prEN 17181:2017****Lubricants –**

Determination of aerobic biological degradation of fully formulated lubricants in an aqueous solution –

Test method based on CO₂-production;

German and English version prEN 17181:2017

Bio-lubrificants –

Détermination de la biodégradabilité aérobie, en solution aqueuse, de lubrifiants complètement formulés –

Méthode basée sur le dégagement de CO₂;

Version allemande et anglaise prEN 17181:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-10-27 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an stellungnahme@fam-hamburg.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Fachausschuss Mineralöl- und Brennstoffnormung (FAM) des NMP, 22205 Hamburg, Postfach 60 05 49, Überseering 40, 22297 Hamburg.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)
Fachausschuss Mineralöl- und Brennstoffnormung (FAM) des NMP

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17181:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 19 „Gasförmige und flüssige Kraft- und Brennstoffe, Schmierstoffe und verwandte Produkte aus Erdöl und mit biologischem oder synthetischem Ursprung“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (die Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 062-06-51 AA „Anforderungen an Schmieröle und sonstige Öle“ im Fachausschuss Mineralöl- und Brennstoffnormung (FAM) des DIN-Normenausschusses Materialprüfung (NMP).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 9439 siehe DIN EN ISO 9439

ISO 3960 siehe DIN EN ISO 3960

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 9439, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wässrigen Medium — Verfahren mit Kohlenstoffdioxid-Messung*

DIN EN ISO 3960, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle — Bestimmung der Peroxidzahl — Iodometrische (visuelle) Endpunktbestimmung*

Schmieröle — Bestimmung des aeroben biologischen Abbaus von vollständig formulierten Schmierstoffen in wässriger Lösung — Prüfverfahren mittels CO₂-Produktion

Bio-lubrifiants — Détermination de la biodégradabilité aérobie, en solution aqueuse, de lubrifiants complètement formulés — Méthode basée sur le dégagement de CO₂

Lubricants — Determination of aerobic biological degradation of fully formulated lubricants in an aqueous solution — Test method based on CO₂-production

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	8
5 Prüfumgebung	9
6 Chemikalien	9
6.1 Wasser	9
6.2 Stammlösungen für das mineralische Medium	9
6.3 Herstellung des mineralischen Mediums	9
7 Prüfgerät	10
8 Durchführung	10
8.1 Herstellung der Prüfvolumen	10
8.2 Vorbereitung des Inokulums	11
8.3 Prüfung	12
9 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	14
9.1 Theoretische Menge an CO ₂ , die von der Prüfprobe freigesetzt wird	14
9.2 Prozentualer biologischer Abbau	14
9.3 Angabe der Ergebnisse	14
10 Gültigkeit und Präzision	15
10.1 Gültigkeit	15
10.2 Präzision	15
11 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Vergleichstabelle der gebräuchlichsten Mineralisierungsverfahren	17
Anhang B (informativ) Zugabe der Probe	23
Anhang C (informativ) Spezifikation der Referenzsubstanz „hoch ölsäurehaltiges Referenzöl (HORO)“	25
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17181:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 19 „Gasförmige und flüssige Kraft- und Brennstoffe, Schmierstoffe und verwandte Produkte aus Erdöl und mit biologischem oder synthetischem Ursprung“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

Bestehende Prüfverfahren für die Bestimmung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe in wässrigem Medium (z. B. zahlreiche ISO- und OECD-Prüfverfahren) sind weit verbreitet. Außerdem arbeiten alle derzeitig vorhandenen Umweltzeichen, internationale und nationale Vorschriften und Empfehlungen mit ihnen.

Die Prüfung organischer Stoffe erfordert ein breites Spektrum an Aufbereitungstools, um vergleichbare Ergebnisse für die unterschiedlichsten Materialien bereitzustellen, die flüssig, fest, wasserlöslich, nicht wasserlöslich oder emulgierbar vorkommen.

Folglich können Ergebnisse je nach Wahl des Prüfverfahrens, Herstellungsverfahrens oder Inokulums variieren und somit zu geringer Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit führen.

Ausformulierte Schmierstoffe (Öle, Fette oder Emulsionen) sind komplexe Gemische aus größtenteils organischen Verbindungen, die vorwiegend wasserunlöslich sind. Basierend auf ISO 9439 (bzw. OECD 301B) wurde dieses Prüfverfahren durch Modifizierung der Probenahme und der Durchführung an derartige komplexe Gemische angepasst, um eine verbesserte Signifikanz der Prüfergebnisse zu erzielen.

Schließlich wird aus Sicht des Kunden ein Prüfverfahren zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit mit verbesserter Signifikanz für das Endprodukt bessere Markttransparenz, gesteigertes Ansehen von „Bio-Schmierstoffen“ und Vertrauen des Kunden in diese Produktgruppe zur Folge haben, selbst wenn kein offizielles Umweltzeichen für die Richtigkeit der Erklärungen steht.

Beispiele für Abbaukurven sind zu einem späteren Zeitpunkt der Erarbeitung des Dokuments vorgesehen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für die Bestimmung des Grades der aeroben Abbaubarkeit ausformulierter Schmierstoffe fest. Das organische Material in einem ausformulierten Schmierstoff wird in einem künstlichen wässrigen Medium einem Inokulum aus Belebtschlamm ausgesetzt.

Die biologische Abbaubarkeit, die zur Mineralisierung des organischen Materials führt, kann durch Messung des freigesetzten CO₂ in einem TOC-Analysator bestimmt werden.

Im Gegensatz zu vorhandenen Prüfverfahren, die freigesetztes CO₂ messen, nutzt dieses Verfahren eine präzise Probenvorbereitung für nicht-wasserlösliches organisches Material.

Das zuvor genannte Verfahren gilt für ausformulierte Schmierstoffe, die:

- a) wasserlöslich, nicht-wasserlöslich oder emulgierbar sind; und
- b) nicht toxisch und nicht hemmend gegenüber den Prüfmikroorganismen bei der Prüfkonzentration sind.

Das Vorhandensein von hemmenden Wirkungen wird nach dieser Europäischen Norm bestimmt.

Dieses Prüfverfahren ist auf Frischwasser als Prüfmedium fokussiert. Prüfungen in Meerwasser sind derzeit in diesem Verfahren nicht erfasst, dürfen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 9439, *Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution test*

ISO 11923:1997, *Water quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>;
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>.

3.1

organisches Material

Gesamtmenge aller organischen Verbindungen, aus denen ein ausformulierter Schmierstoff besteht

3.2

aerober Bioabbau

Verbrauch organischen Materials durch Mikroorganismen in einem biochemischen Prozess unter Verwendung von Sauerstoff, der zur Spaltung chemischer Bindungen und zur Erzeugung von CO₂ führt, wobei Energie und/oder neue Biomasse entsteht

3.3

Primärabbau

strukturelle Veränderung (Transformation) einer chemischen Verbindung durch Mikroorganismen, die zu einem Verlust spezifischer Eigenschaften führt

3.4

Mineralisierung

aerober Bioabbau organischen Materials durch Mikroorganismen zu Kohlenstoffdioxid, Wasser und mineralischen Salzen jeglicher sonstiger vorliegender Elemente (Mineralisierung) sowie neuer Biomasse

3.5

Belebtschlamm

Biomasse, die bei der aeroben Behandlung von Abwasser durch das Wachstum von Bakterien und anderen Mikroorganismen in Gegenwart von gelöstem Sauerstoff entsteht

3.6

Konzentration der suspendierten Stoffe eines Belebtschlammes

Menge an Feststoffen, die durch Filtration oder Zentrifugation eines bekannten Belebtschlammvolumens und Trocknung bei etwa 105 °C bis zur Massenkonzanz erhalten wird

3.7

Inokulum

Belebtschlammprobe, die in Abbauprozessen verwendet wird, die in diesem Verfahren beschrieben sind

3.8

Referenzsubstanz

organische Verbindung bekannter biologischer Abbaubarkeit mit einem Abbaugrad über 60 %

3.9

gelöster organischer Kohlenstoff

DOC

Teil des organischen Kohlenstoffs in Wasser, der durch ein festgelegtes Phasentrennverfahren nicht abgetrennt werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispielsweise durch Zentrifugation bei 4 000 U/min für 15 min oder durch Membranfiltration mit Membranen, deren Porendurchmesser 0,2 µm bis 0,45 µm beträgt.

3.10

gesamter anorganischer Kohlenstoff

TIC

Gesamtmenge anorganischen Kohlenstoffs in einer Wasserprobe, der aus Kohlenstoffdioxid und Karbonaten stammt

3.11

gelöster anorganischer Kohlenstoff

DIC

Teil des anorganischen Kohlenstoffs in Wasser, der durch ein festgelegtes Phasentrennverfahren nicht abgetrennt werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispielsweise durch Zentrifugation bei 4 000 U/min für 15 min oder durch Membranfiltration mit Membranen, deren Porendurchmesser 0,2 µm bis 0,45 µm beträgt.

3.12

theoretische Menge an freigesetztem Kohlenstoffdioxid **ThCO₂**

maximale theoretische Menge an Kohlenstoffdioxid, das nach totaler Oxidation eines Schmierstoffs freigesetzt wird, berechnet aus dem TOC-Gehalt

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird in diesem Fall angegeben in Milligramm freigesetztes Kohlenstoffdioxid je Milligramm oder Gramm Prüfsubstanz.

3.13

gesamter organischer Kohlenstoff **TOC**

Menge Kohlenstoff, gebunden in einer organischen Substanz

Anmerkung 1 zum Begriff: Weitere Einzelheiten siehe ISO 8245 [17].

3.14

biochemischer Sauerstoffbedarf **BSB**

Massenkonzentration an gelöstem Sauerstoff, die unter festgelegten Bedingungen durch die aerobe biologische Oxidation einer chemischen Verbindung oder organischen Substanz in Wasser verbraucht wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird in diesem Fall angegeben in Milligramm Sauerstoffaufnahme je Milligramm oder Gramm der Prüfsubstanz.

3.15

chemischer Sauerstoffbedarf **CSB**

Massenkonzentration an Sauerstoff, die der Menge eines festgelegten Oxidationsmittels entspricht, das von einer chemischen Verbindung oder organische Substanz bei der Behandlung einer Wasserprobe mit diesem Oxidationsmittel unter definierten Bedingungen verbraucht wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird in diesem Fall angegeben in Milligramm Sauerstoffverbrauch je Milligramm oder Gramm der Prüfsubstanz.

3.16

theoretischer Sauerstoffbedarf **ThOD**

theoretische maximale Menge an Sauerstoff, die benötigt wird, um eine chemische Verbindung oder chemische Substanz vollständig zu oxidieren, berechnet aus der Elementanalyse

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird in diesem Fall angegeben in Milligramm Sauerstoffaufnahme je Milligramm oder Gramm der Prüfsubstanz

3.17

Lag-Phase

Verzögerungsphase

Zeit zwischen dem Beginn einer Prüfung und dem Erreichen einer ausreichenden Adaption und/oder Selektion der abbauenden Mikroorganismen sowie einem Anstieg des Grades des Bioabbaus einer chemischen Verbindung oder einer organischen Substanz bis auf etwa 10 % des theoretisch maximalen Grades des Bioabbaus

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird angegeben in Tagen.

3.18

maximaler Grad des Bioabbaus

maximaler Grad des Bioabbaus einer chemischen Verbindung oder einer organischen Substanz in einer Prüfung, oberhalb dessen während dieser Prüfung kein weiterer Bioabbau stattfindet

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird angegeben in Prozent.

3.19

Bioabbauphase

Zeit vom Ende der Lag-Phase einer Prüfung bis zu dem Zeitpunkt, an dem etwa 90 % des maximalen Bioabbaugrades erreicht sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird angegeben in Tagen.

3.20

Plateauphase

Zeit vom Ende der Bioabbauphase, wenn der maximale Bioabbaugrad erreicht ist, bis zum Ende einer Prüfung

3.21

Vorkonditionierung

vorgeschaltete Inkubation eines Inokulums unter den Bedingungen der nachfolgenden Prüfung, jedoch ohne das Vorliegen der zu prüfenden chemischen Verbindung oder organischen Substanz, wobei das Ziel darin besteht, die Prüfung durch Akklimatisierung der Mikroorganismen an die Prüfbedingungen zu verbessern

3.22

Voradaption

vorgeschaltete Inkubation eines Inokulums in Gegenwart der zu prüfenden chemischen Verbindung oder organischen Substanz, deren Ziel darin besteht, durch Adaption und/oder Selektion der Mikroorganismen die Fähigkeit des Inokulums zum Bioabbau der Prüfsubstanz zu erhöhen

4 Kurzbeschreibung

Der biologische Abbau wird über einen festgelegten Zeitraum durch Messung der Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Produktion verfolgt. Die Entwicklung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) wird mittels Verfahren mit Kohlenstoffdioxid-Messung (wie in ISO 9439) bestimmt und mit der theoretischen Menge an freigesetztem Kohlenstoffdioxid (ThCO₂) verglichen.

Der Mineralisierungsprozess eines ausformulierten Schmierstoffs (siehe auch Anhang A) wird mit Hilfe von aeroben Mikroorganismen in einem statischen wässrigen Prüfsystem bestimmt. Das Prüfsystem besteht aus einem mineralischen Medium, Belebtschlamm, der aus einer Kläranlage mit überwiegend häuslichem Abwasser als Inokulum stammt, und dem organischen Material (die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle).

Dieses Gemisch wird in Prüfgefäßen gerührt und mit CO₂-freier Luft bis zu 28 Tage belüftet. Das CO₂, das durch den mikrobiologischen Abbau freigesetzt wird, wird in externen Gefäßen aufgefangen, mit Hilfe eines geeigneten Analysenverfahrens bestimmt und als Prozentwert von ThCO₂ angegeben.

Wenn ein stoffspezifisches Analysenverfahren zur Verfügung steht, können zusätzliche Informationen zum Primärabbau erhalten werden.

Das gilt nicht für wasserunlösliche Schmierstoffe oder Ansätze, die teilweise aus wasserunlöslichen oder flüchtigen Verbindungen bestehen.

5 Prüfungsumgebung

Die Inkubation muss im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung erfolgen, bei einer Temperatur, die in einem Bereich von 20 °C bis 25 °C liegt und während der Prüfung nicht mehr als ± 1 °C schwanken darf.

6 Chemikalien

Es sollten ausschließlich Chemikalien anerkannter analytischer Reinheit verwendet werden.

6.1 Wasser

Wasser sollte destillierte oder entmineralisierte Qualität mit einem DOC-Gehalt unter 1 mg/l haben.

Prüfungen in Meerwasser müssen mit marinen Mikroorganismen und nicht-synthetischem, natürlichen Meerwasser durchgeführt werden; weitere Erläuterungen sind Anhang A zu entnehmen.

6.2 Stammlösungen für das mineralische Medium

Folgende Stammlösungen sind herzustellen:

(a) Kaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4	8,50 g
Dikaliumhydrogenorthophosphat, K_2HPO_4	21,75 g
Dinatriumhydrogenorthophosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
In Wasser auflösen und auf 1 l aufzufüllen	
Der pH-Wert der Lösung sollte 7,4 betragen.	
(b) Calciumchlorid, wasserfrei, CaCl_2 oder	27,50 g
Calciumchlorid-Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g
In Wasser auflösen und auf 1 l aufzufüllen	
(c) Magnesiumsulphat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
In Wasser auflösen und auf 1 l aufzufüllen	
(d) Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
In Wasser auflösen und auf 1 l aufzufüllen	

ANMERKUNG Damit diese Lösung nicht unmittelbar vor Gebrauch zubereitet werden muss, ist ein Tropfen konzentrierter Salzsäure (HCl) je Liter zuzugeben. Bildet sich in einer Stammlösung ein Niederschlag, ist sie durch eine frisch hergestellte Lösung zu ersetzen.

6.3 Herstellung des mineralischen Mediums

10 ml Lösung (a) sind mit 800 ml Wasser zu mischen, anschließend ist jeweils 1 ml der Lösungen (b), (c) und (d) zuzugeben und mit Wasser auf 1 l aufzufüllen.

7 Prüfgerät

Es ist sicherzustellen, dass alle Glasgeräte sorgfältig gereinigt und frei von organischen oder toxischen Stoffen sind.

7.1 Prüfgefäße, Glasgeräte für Belüftung, mit Schlauchverbindung, undurchlässig für Kohlenstoffdioxid, mit Möglichkeit zum Schütteln der Behälter oder Rühren in den Behältern.

7.2 Wasserbad oder temperaturkonstanter Raum (nach Abschnitt 5).

7.3 Vorrichtung zur Produktion CO₂-freier Luft, mit der eine konstante Belüftung aller Prüfgefäße mit einem Durchfluss von etwa 50 ml/min bis 100 ml/min für bis zu 3 l Medium möglich ist.

7.4 Ausrüstung zur Bestimmung des entstandenen Kohlenstoffdioxids, jedes geeignete Messgerät oder jede Analysetechnik mit ausreichender Empfindlichkeit, z. B. CO₂- oder DIC-Analysatoren oder Einrichtungen zur titrimetrischen Bestimmung nach vollständiger Absorption in alkalischer Lösung.

7.5 Zentrifuge oder Filtrationsvorrichtung, die eine Beschleunigung von 4 000 U/min erzeugen kann.

Für die Filtrationsvorrichtung muss ein Filtermaterial verwendet werden, das keinen organischen Kohlenstoff adsorbiert oder freisetzt. Die nominale Porenweite muss 0,2 µm bis 0,45 µm betragen.

7.6 pH-Messgerät, optional.

7.7 Ausrüstung zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) (optional), mit ausreichender Empfindlichkeit für die Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC).

Nur bei ausreichend wasserlöslichem organischem Material darf die Entfernung gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) durch Messung der DOC-Konzentration zu Beginn und zum Ende der Inkubation bestimmt werden (optional), um zusätzliche Informationen zur Bioabbaubarkeit zu erhalten.

8 Durchführung

8.1 Herstellung der Prüfvolumen

8.1.1 Prüfprobe

Eine geeignete Menge organischen Materials ist in die Prüfgefäße zu geben, um in dem mineralischen Medium eine Konzentration organischen Kohlenstoffs von 10 mg/l bis 20 mg/l zu erhalten (möglichst 20 mg/l, wenn keine Hemmung erwartet wird).

Es ist eine Stammlösung des Schmierstoffs in einem organischen Lösemittel herzustellen, das zum vollständigen Auflösen des Schmierstoffs geeignet ist, z. B. Azeton, Toluol, im Hinblick auf die restlose Entfernung des Lösemittels möglichst Hexan. Die Stammlösung in dem Lösemittel wird unter einem kontinuierlichen Luftstrom auf Glasfaserfilter (Durchmesser < 50 mm) aufgetragen. Die Glasfaserfilter sollten vor dem Gebrauch mit Lösemittel gespült werden, um organische Spurenstoffe zu entfernen.

Nachdem das Lösemittel restlos verdunstet ist (Kontrolle: Gewicht vor und nach Verwendung der Stammlösung), wird der Filter für 3 h bei 40 °C inkubiert, um Lösemittelspuren zu entfernen. Blind- und Referenzgefäße werden auf dieselbe Weise behandelt, indem nur Hexan zu den Glasfaserfiltern gegeben wird. Die Filter werden direkt in die Prüflösungen gegeben. Die Konzentration in der Stammlösung sollte so sein, dass 0,5 ml Stammlösung je Liter des endgültigen Mediums verwendet werden.

ANMERKUNG 1 In Anhang B ist ein Vergleich verschiedener Herstellungsverfahren angegeben. Weitere Einzelheiten siehe DIN 51828-1 [4] oder ISO 10634.

Je nach Eigenschaften der Prüfprobe und dem Zweck der Prüfung dürfen auch andere Konzentrationen verwendet werden. Die zugegebene Menge ist genau zu bestimmen.

Schmierstoffe, die flüchtige Verbindungen enthalten, sollten mit dem Verfahren in einem geschlossenen Respirometer geprüft werden, vorausgesetzt, die Prüfung erfolgt unter geeigneten Bedingungen. Außerdem darf der Gehalt an flüchtigen Verbindungen mit Verfahren wie z. B. Verfahren nach Noack (DIN 51581 [2] oder ASTM D 5800 [1]) bestimmt werden.

ANMERKUNG 2 ISO 9439 lässt Konzentrationen organischen Kohlenstoffs von 10 mg/l bis 40 mg/l zu. Bei ausformulierten Schmierstoffen kann eine Konzentration von 10 mg/l zu einem zu geringen Gehalt organischen Materials in der Prüfprobe führen, aber 40 mg/l können die Bildung homogener Prüflösungen erschweren im Hinblick auf die eingeschränkte Wasserlöslichkeit der meisten Schmierstoffe.

8.1.2 Referenzsubstanz

Zur Überprüfung des Verfahrens sollte eine Referenzsubstanz bekannter biologischer Abbaubarkeit parallel geprüft werden. Bei der Prüfung wasserlöslicher Prüfsubstanzen darf Natriumbenzoat oder Anilin verwendet werden; bei schwer löslichen Prüfsubstanzen ist HOSO (hoch ölsäurehaltiges Sonnenblumenöl) zu verwenden. Die Qualität von HORO (hoch ölsäurehaltiges Referenzöl) ist Anhang C zu entnehmen.

Die Referenzsubstanz ist auf dieselbe Weise in das mineralische Medium (6.3) zu geben wie das organische Material in die Prüfprobe (8.1.1).

8.1.3 Hemmkontrolle

Falls erforderlich (z. B. bei Material mit toxischem Potential), ist eine Lösung organischen Materials (8.1.1) und Referenzsubstanz (8.1.2) zu verwenden, jeweils vorzugsweise mit einer Konzentration organischen Kohlenstoffs von 20 mg/l in mineralischem Medium (6.3).

8.2 Vorbereitung des Inokulums

8.2.1 Allgemeines

Das Inokulum ist herzustellen, um eine Mikroorganismenpopulation zu erhalten, die eine ausreichend hohe Bioabbauaktivität gestattet. Die Inokulumaktivität ist mit Hilfe der Positivkontrolle (8.1.1) zu überprüfen. Die CO₂-Produktion oder der BSD der Blindprobe muss die Gültigkeitskriterien (10.1) erfüllen.

8.2.2 Inokulum aus einer Belebtschlammanlage

Aus dem Belebungsbecken einer Kläranlage, in der vor allem kommunale Abwässer behandelt werden, ist eine Probe Belebtschlamm zu entnehmen. Die Probe ist gut zu mischen und die Konzentration an suspendierten Stoffen des Belebtschlammes ist zu bestimmen (z. B. nach ISO 11923). Falls erforderlich, ist der Schlamm durch Absetzen zu konzentrieren, so dass das den Testansätzen zugegebene Volumen möglichst klein ist, aber dennoch die Kriterien von 8.2.1 erfüllt. Wenn anzunehmen ist, dass der Schlamm hemmende Substanzen enthält, ist der Schlamm zu zentrifugieren, mit mineralischem Medium (6.3) zu spülen, erneut zu zentrifugieren und in dem Medium absetzen zu lassen. Die Probe ist unter aeroben Bedingungen zu halten und vorzugsweise am Tag der Entnahme zu verwenden. Es ist ein geeignetes Volumen zu verwenden, so dass 30 mg/l suspendierte Stoffe vorliegen, bezogen auf die Trockenmasse im Endgemisch.

ANMERKUNG Geeignetes Volumen bedeutet erfahrungsgemäß:

- ausreichend, um eine Population mit genügend Bioabbauaktivität zu ermöglichen;
- baut die Referenzsubstanz zum vorgesehen Prozentgrad ab (siehe 11.1);
- die Menge an gelöstem organischen Kohlenstoff, das vom Inokulum stammt, sollte weniger als 10 % der ursprünglichen Konzentration des organischen Kohlenstoffs der zugegebenen Prüfsubstanz sein.

8.2.3 Vorkonditionierung

Es kann hilfreich sein, das Inokulum vorzukonditionieren, um den Einfluss des Blindwerts zu verringern, z. B. durch Belüften bis zu einer Woche vor seiner Verwendung.

8.2.4 Voradaption

Es darf keine Voradaption des Inokulums mit der Prüfsubstanz durchgeführt werden.

8.3 Prüfung

Die Vorrichtung für die CO₂-freie Luft (siehe Abschnitt 7) ist aufzustellen und eine ausreichende Anzahl an Prüfgefäßen (7.2) ist vorbereiten:

- mindestens 2 Prüfgefäße (F_T) für die Prüfprobe (8.1.1);
- mindestens 2 Prüfgefäße (F_C) für die Positivkontrolle (8.1.2) mit der Referenzsubstanz;
- mindestens 2 Prüfgefäße (F_B) für die Blindkontrolle mit mineralischem Medium (6.3) und nur Inokulum (8.2.2);
- optional, falls erforderlich:
- 1 Prüfgefäß (F_I) für die Hemmkontrolle (8.1.3);
- 1 Prüfgefäß (F_S) für die abiotische Eliminationskontrolle mit Prüfprobe (8.1.1), aber ohne Inokulum (8.2). Das Prüfgefäß muss durch Zugabe einer geeigneten anorganischen toxischen Substanz sterilisiert werden, um mikrobiologische Aktivitäten zu unterbinden.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die gewünschten Endvolumen.

In die Prüfgefäße sind ausreichende Mengen mineralisches Medium (6.3) und Inokulum (8.2) zu geben, damit die in Tabelle 1 angegebenen gewünschten Endvolumen erhalten werden. Andere Prüfvolumen als 3 l sind zulässig; in diesem Fall müssen alle relevanten Parameter und die Berechnung angepasst werden. Die Prüfgefäße sind mit der Vorrichtung zur Produktion von CO₂-freier Luft zu verbinden.

Tabelle 1 — Überblick über die gewünschten Endvolumen

Prüfgefäß	Mineralisches Medium 6.3	Organisches Material 8.1.1	Referenzsubstanz 8.1.2	Inokulum 8.2
Prüfprobe				
F_T1	+	+	–	+
F_T2	+	+	–	+
Referenzkontrolle				
F_C1	+	–	+	+
F_C2	+	–	+	+
Blindkontrolle				
F_B1	+	–	–	+
F_B2	+	–	–	+
Hemmkontrolle (optional)				
F_I	+	+	+	+
Abiotische Eliminations- kontrolle (optional)				
F_S	+	+	–	–

Sämtliche Prüfgefäße sind in einen temperaturkonstanten Raum zu stellen, ihnen ist Zeit zu lassen, die gewünschte Temperatur zu erreichen, und sie sind 24 h mit CO₂-freier Luft zu belüften, um in den Gefäßen bereits vorhandenes CO₂ auszuspülen. Die Gefäße sind zu verschließen und der Magnetrührer ist zu starten. Wenn eine Schaumbildung beobachtet wird, ist weiter zu rühren, ohne mit CO₂-freier Luft zu spülen. Nach der Vorbelüftung sind die Abluftstutzen eines jeden Gefäßes mit der Vorrichtung zum Auffangen und zur weiteren Bestimmung des Kohlenstoffdioxids zu verbinden.

Die Prüfsubstanz (8.1.1) und die Referenzsubstanz (8.1.2) sind in der gewünschten Konzentration in die jeweiligen Gefäße nach Tabelle 1 zu geben und die Prüfung ist durch Belüftung der Behälter mit CO₂-freier Luft mit dem gewünschten Medium mit etwa 50 ml/min bis 100 ml/min zu starten.

Die Messungen der Kohlenstoffdioxidproduktion sind mit einem geeigneten Analysenverfahren vorzunehmen. Wenn eine nahezu konstante Kohlenstoffdioxidbildung eingesetzt hat (Plateauphase) und kein weiterer biologischer Abbau erwarten wird, gilt die Prüfung als beendet. In der Regel darf die Prüfdauer 28 Tage nicht überschreiten. Gegebenenfalls ist die Messung auf 35 Tage oder 42 Tage zu verlängern, wenn der Abbau offensichtlich begonnen hat, eine Plateauphase aber nicht erreicht wurde.

Am letzten Testtag sind die pH-Werte in den Prüfgefäßen zu bestimmen, danach sind alle Ansätze mit 1 ml bis 10 ml konzentrierter Salzsäure zu versetzen, um das Carbonat und Hydrogencarbonat auszutreiben. Die Belüftung ist weitere 24 h fortzusetzen, dann die Menge an Kohlenstoffdioxid für jedes Gefäß zu bestimmen.

9 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

9.1 Theoretische Menge an CO₂, die von der Prüfprobe freigesetzt wird

Die theoretische Menge an freigesetztem CO₂ (ThCO₂), in mg, muss nach Gleichung (1) berechnet werden:

$$\text{ThCO}_2 = \rho \cdot c \cdot V_L \cdot \left(\frac{44}{12}\right) \quad (1)$$

Dabei ist

ρc die Konzentration an organischem Kohlenstoff der Prüfprobe in Behälter F_T , gemessen oder aus der Stammlösung der Prüfprobe (8.1.1) berechnet, in mg/l;

V_L das Volumen der Prüfprobe in Gefäß F_T , in l.

Auf dieselbe Weise muss die ThCO₂ aus Referenzsubstanz und Hemmlösung (7.1.3) berechnet werden.

9.2 Prozentualer biologischer Abbau

Der prozentuale biologische Abbau D_m , in %, muss für jeden Prüfbehälter F_T für jedes Messintervall nach Gleichung (2) berechnet werden:

$$D_m = \frac{\sum m_{Tt} - \sum m_{Bt}}{\text{ThCO}_2} \quad (2)$$

Dabei ist

$\sum m_{Tt}$ die Masse Kohlenstoffdioxid, die ab Beginn der Prüfung bis zum Zeitpunkt t freigesetzt wurde, in mg;

$\sum m_{Bt}$ die mittlere Masse Kohlenstoffdioxid, die in der Blindkontrolle ab Beginn der Prüfung bis zum Zeitpunkt t freigesetzt wurde, in mg.

Auf dieselbe Weise sind der prozentuale Abbau der Referenzsubstanz und, falls erfolgt, der abiotischen Eliminationskontrolle und/oder der Hemmkontrolle zu berechnen.

9.3 Angabe der Ergebnisse

Aus den gemessenen Werten des freigesetzten CO₂ ($\sum m_{Tt}$ und $\sum m_{Bt}$) und den prozentualen Werten des Bioabbaus D_m für jedes Messintervall und jedes Prüfgefäß ist eine Tabelle zu erstellen. Eine Abbaukurve ist zu erstellen, in der die Prozentwerte als Funktion der Zeit aufgetragen werden, und die Lag-Phase und die Abbauphase sind zu kennzeichnen. Wenn für die doppelten Prüfgefäße F_T (10.1) vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden, ist eine Abbaukurve mit dem Mittelwert zu erstellen, andernfalls sind Abbaukurven für jeden Behälter zu erstellen. Auf dieselbe Weise ist eine Bioabbaukurve der Referenzsubstanz F_C zu erstellen und, falls erfolgt, der abiotischen Eliminationskontrolle F_S und der Hemmkontrolle F_I .

Der Mittelwert des prozentualen Bioabbaus ist in der Plateauphase zu bestimmen oder, z. B. wenn die Kurve in der Plateauphase abfällt, ist der Höchstwert zu verwenden; dieser maximale Grad des Bioabbaus ist als „Grad des Bioabbaus der Prüfprobe“ im Prüfbericht anzugeben.