

DIN EN 17417

ICS 13.030.99; 83.080.01

Einsprüche bis 2019-09-19
Vorgesehen als Ersatz für
DIN SPEC 7700:2015-02

Entwurf

**Bestimmung der vollständigen Bioabbaubarkeit von
Kunststoff-Materialien in wässriger Phase unter anoxischen
(denitrifizierenden) Bedingungen –
Verfahren mittels Messung der Druckzunahme;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17417:2019**

Determination of the ultimate biodegradation of plastics materials in an aqueous system
under anoxic (denitrifying) conditions –

Method by measurement of pressure increase;
German and English version prEN 17417:2019

Détermination de la biodégradation ultime des matériaux plastiques dans un système aqueux
dans des conditions anoxiques (dénitrifiantes) –

Méthode par mesure de l'augmentation de pression;
Version allemande et anglaise prEN 17417:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-19 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 fnk@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Kunststoffe (FNK), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

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 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Kunststoffe (FNK)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17417:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 249 „Kunststoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NBN (Belgien) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 054-01-07 AA „Bioabbaubare Kunststoffe“ im DIN-Normenausschuss Kunststoffe (FNK).

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 10210	siehe	DIN EN ISO 10210
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696

Änderungen

Gegenüber DIN SPEC 7700:2015-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Überführung der DIN SPEC 7700 in eine Europäische Norm.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10210, *Kunststoffe — Verfahren für die Probenvorbereitung zur Prüfung des Bioabbaus von Kunststoff-Materialien*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen*

Bestimmung der vollständigen Bioabbaubarkeit von Kunststoff-Materialien in wässriger Phase unter anoxischen (denitrifizierenden) Bedingungen — Verfahren mittels Messung der Druckzunahme

Détermination de la biodégradation ultime des matériaux plastiques dans un système aqueux dans des conditions anoxiques (dénitrifiantes) — Méthode par mesure de l'augmentation de pression

Determination of the ultimate biodegradation of plastics materials in an aqueous system under anoxic (denitrifying) conditions — Method by measurement of pressure increase

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung.....	9
5 Geräte und Materialien	9
6 Vorbereitung.....	12
6.1 Bestimmung der Volumina der jeweiligen Reaktionsgefäße	12
6.2 Probenvorbereitung.....	12
6.3 Vorbereitung des Mediums.....	12
6.3.1 Reagenzien	12
6.3.2 Destilliertes oder deionisiertes Wasser	12
6.3.3 Herstellung der Konzentrate.....	12
6.3.4 Vorbereitung des Mediums.....	14
6.4 Vorbereitung des Inokulums.....	14
7 Durchführung der Versuche	15
7.1 Beginn der Prüfung.....	15
7.2 Bestimmung der Anfangskonzentrationen (Analytikprobe).....	16
7.2.1 Bestimmung des pH-Wertes	16
7.2.2 Bestimmung der suspendierten Stoffe des Inokulums	16
7.2.3 Bestimmung von Ammonium-Stickstoff, Nitrit-Stickstoff und Nitrat-Stickstoff (für eine Stickstoff-Bilanz)	17
7.2.4 Proteinbestimmung (für eine Stickstoff- und Kohlenstoff-Bilanz)	17
7.2.5 DOC-Bestimmung (für eine Kohlenstoff-Bilanz)	17
7.3 Inkubationsperiode.....	17
7.4 Ende der Prüfung.....	17
7.5 Bestimmung des in den Absorptionsgefäßen absorbierten CO ₂ (für eine Kohlenstoff-Bilanz).....	17
8 Berechnung und Auswertung.....	18
8.1 Berechnung der theoretischen N ₂ -Produktion	18
8.2 Berechnung der aktuellen N ₂ -Produktion	18
8.3 Berechnung des Abbaugrades bezogen auf die Stickstoffproduktion	19
8.4 Erstellung einer Stickstoff-Bilanz	20
8.5 Auswertung und Angabe der Ergebnisse.....	20
9 Gültigkeit der Ergebnisse	21
10 Prüfbericht	21
Anhang A (informativ) Versuchsplanung — Berechnung der maximal zulässigen Einwaage der Prüfschubstanz und der Mindest-Nitratkonzentration.....	23
A.1 Allgemeines.....	23
A.2 Obere Messgrenze der Druckmessung.....	23

A.3	Sorptionskapazität der Sorptionslösung (falls anwendbar).....	24
A.4	pH-Pufferkapazität des Mediums.....	24
A.5	Mindest-Nitratkonzentration.....	25
Anhang B (informativ) Beispiele für Abbaukurven.....		26
Anhang C (informativ) Berechnung des produzierten anorganischen Kohlenstoffs und Erstellung einer Kohlenstoffbilanz.....		28
C.1	Berechnung des produzierten anorganischen Kohlenstoffs.....	28
C.2	Erstellung einer Kohlenstoff-Bilanz.....	29
C.3	Berechnung des Grades des Bioabbaus bezogen auf den Kohlenstoff.....	30
Literaturhinweise.....		31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17417:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 249 „Kunststoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NBN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Der Bioabbau einer chemischen Substanz hängt sehr stark von den Umweltbedingungen ab. Eine wesentliche Voraussetzung dafür, auf welchen Stoffwechselwegen ein Abbau von Bakterien durchgeführt werden kann, ist die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff. Es gibt derzeit bereits einige Prüfverfahren zur Untersuchung der Bioabbaubarkeit von Polymeren unter aeroben Bedingungen, jedoch nur wenige zur Untersuchung der Bioabbaubarkeit unter anaeroben Bedingungen. Kaum Beachtung fand jedoch bislang der Abbau unter anoxischen (denitrifizierenden) Bedingungen. Der Begriff „anoxisch“ wurde von Ingenieuren geprägt und bezeichnet Bedingungen, unter denen eine Denitrifikation stattfinden kann. Das bedeutet, dass wenig oder kein Sauerstoff ($< 0,1 \text{ mg/l}$), jedoch Nitrat ($> 0,1 \text{ mg/l NO}_3^- \text{-N}$) vorhanden ist. Bei der heterotrophen Denitrifikation, beispielsweise im Denitrifikationsbecken einer Kläranlage, wird Nitrat zu Stickstoff reduziert und organisches Substrat gleichzeitig zu CO_2 oxidiert. In der Natur können anoxische Bedingungen im Hypolimnion von eutrophen Seen oder im Sediment am Übergang zwischen aerober und anaerober Zone vorliegen.

Eine Möglichkeit der Verwendung von bioabbaubaren Polymeren nach der vorgesehenen Gebrauchsdauer ist deren Zugabe als zusätzliche Kohlenstoffquelle zur Denitrifikationseinheit einer Kläranlage. Um zu prüfen, ob diese Art der Verwertung eines Polymers möglich ist, muss die biologische Abbaubarkeit unter anoxischen (denitrifizierenden) Bedingungen ermittelt werden. Selbst wenn ein Stoff aerob gut abbaubar ist, gilt dies nicht zwangsläufig für anoxische Bedingungen.

Weiter ist zu unterscheiden zwischen biologisch abbaubaren Polymeren, die wasserlöslich sind, und solchen, die nicht wasserlöslich sind.

Die wasserlöslichen und biologisch abbaubaren Polymere könnten gezielt und kontinuierlich der Denitrifikationseinheit als Festsubstrat zudosiert werden, das schnell umgesetzt wird und so die Zugabe einer externen flüssigen Kohlenstoffquelle, wie z. B. Ethanol oder Essigsäure, ersetzen kann. Eine Prüfung ihrer aeroben Abbaubarkeit, ihrer Wasserlöslichkeit und gegebenenfalls Wasserdispergierbarkeit kann nach EN 14987 erfolgen. In Ergänzung dazu erfolgt die spezielle Prüfung auf ihren Einsatz als Kohlenstoffquelle für die Denitrifikation nach dieser Norm. Solange diese bioabbaubaren Polymere als Festsubstanz vorliegen, muss dafür Sorge getragen werden, dass sie im Denitrifikationsbecken verbleiben, um betriebliche Störungen in den weiteren Stufen der Kläranlage zu vermeiden.

Die wasserunlöslichen und biologisch abbaubaren Polymere werden als Festsubstanzen diskontinuierlich in einen speziell gestalteten Denitrifikationsreaktor eingebracht, wo sie durch geeignete Prozessführung weitgehend verbleiben. Durch bakterielle Aktivität induziert, geben sie kontinuierlich Kohlenstoff für die Denitrifikation ab, in einem je nach ihren Abmessungen (Oberflächen-/Volumenverhältnis) lang andauernden Prozess des anoxischen Abbaus. Die spezielle Prüfung auf ihren Einsatz als wasserunlösliche Kohlenstoffquelle für die Denitrifikation wird in dieser Norm beschrieben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren fest, mit dem durch Messung der Menge des produzierten Stickstoffs und des gebildeten Kohlenstoffdioxids am Ende der Prüfung die vollständige anoxische Bioabbaubarkeit von Kunststoffen aus organischen Verbindungen bestimmt wird.

Die Prübsubstanz wird einem Inokulum ausgesetzt, das aus einem Denitrifikationsbecken einer Kläranlage stammt. Die Prüfung erfolgt unter definierten Bedingungen im Labor.

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).

EN 872:2005, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung suspendierter Stoffe — Verfahren durch Abtrennung mittels Glasfaserfilter*

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

**3.1
vollständiger anoxischer Bioabbau**
Zersetzung einer organischen Verbindung zu Kohlenstoffdioxid, Wasser und mineralischen Salzen jeglicher sonstiger vorliegender Elemente (Mineralisierung) sowie neuer Biomasse durch Mikroorganismen in Gegenwart von oxidierten Stickstoffverbindungen (Nitrat, Nitrit) und in Abwesenheit von Sauerstoff

**3.2
suspendierte Stoffe**
Stoffe, die unter festgelegten Bedingungen durch Filtration entfernt werden

[QUELLE: EN 872:2005, 3.1]

**3.3
gelöster anorganischer Kohlenstoff
DIC**

der Teil des anorganischen Kohlenstoffs in Wasser, der durch ein festgelegtes Phasentrennverfahren, beispielsweise durch Zentrifugation bei $40\,000\text{ m s}^{-2}$ für 15 min oder durch Membranfiltration mit Membranen, deren Porendurchmesser $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $0,45\text{ }\mu\text{m}$ beträgt, nicht abgetrennt werden kann

[QUELLE: EN ISO 14852:2004, 3.4] [1]

3.4

Lag-Phase

Verzögerungsphase

in Tagen gemessene 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 maximalen Grades des Bioabbaus

[QUELLE: EN ISO 14855-1:2013, 3.7] [2]

3.5

Grad des Bioabbaus bezogen auf die Stickstoffproduktion

gemessener Grad des Bioabbaus einer chemischen Verbindung oder einer organischen Substanz in einer Prüfung, berechnet aus dem Quotienten der Menge des tatsächlich produzierten Stickstoffs und der theoretischen maximalen Menge an Stickstoff

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird in Prozent angegeben.

3.6

Grad des Bioabbaus bezogen auf den Kohlenstoff

gemessener Grad des Bioabbaus einer chemischen Verbindung oder einer organischen Substanz in einer Prüfung, berechnet aus den Endprodukten der Mineralisierung des Kohlenstoffanteils (Kohlenstoffmenge aus Kohlenstoffdioxid und Biomasse) dividiert durch den Kohlenstoffanteil der eingesetzten Prüfsubstanzmenge

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird in Prozent angegeben.

3.7

maximaler Grad des Bioabbaus

gemessener 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 in Prozent angegeben.

[QUELLE: EN ISO 14855-1:2013, 3.8, modifiziert — die Einheit „Prozent“ wurde in die Anmerkung aufgenommen] [2]

3.8

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 in Tagen angegeben.

[QUELLE: EN ISO 14855-1:2013, 3.9, modifiziert — die Einheit „Tage“ wurde in die Anmerkung aufgenommen] [2]

3.9

Plateauphase

Zeit vom Ende der Bioabbauphase bis zum Ende der Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird in Tagen angegeben.

[QUELLE: EN ISO 14855-1:2013, 3.10, modifiziert — die Einheit „Tage“ wurde in die Anmerkung aufgenommen] [2]

3.10

Stickstoff-Wiederfindungsrate

Summe der Massenkonzentrationen der Stickstoffanteile von Nitrat, Nitrit, Ammonium, Protein und elementarem Stickstoff am Ende der Prüfung dividiert durch die Summe der entsprechenden Massenkonzentrationen am Beginn der Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird in Prozent angegeben.

3.11

Kohlenstoff-Wiederfindungsrate

Summe der Massenkonzentrationen des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC, en: dissolved organic carbon), der Kohlenstoffanteile von Prüfsubstanz, Kohlenstoffdioxid und Biomasse am Ende der Prüfung dividiert durch die Summe der entsprechenden Massenkonzentrationen am Beginn der Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird in Prozent angegeben.

3.12

theoretischer Sauerstoffbedarf

ThOD

theoretisch maximale Menge an Sauerstoff, die benötigt wird, um eine chemische Verbindung vollständig zu oxidieren

Anmerkung 1 zum Begriff: Er wird aus der Molekülformel dieser Verbindung berechnet und als Milligramm der Aufnahme an Sauerstoff je Milligramm der Prüfverbindung angegeben.

3.13

theoretische Stickstoffproduktion

ThNP

theoretisch maximale Menge an Stickstoff, die beim Bioabbau unter denitrifizierenden Bedingungen produziert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird aus der Molekülformel der Prüfverbindung und der Stöchiometrie des anoxischen Bioabbaus dieser Verbindung berechnet (vereinfacht, ohne Biomasse) und als Milligramm der Produktion von Stickstoff je Milligramm der Prüfverbindung angegeben.

3.14

theoretischer Nitratbedarf

ThND

theoretisch maximale Menge an Nitrat-Stickstoff, die beim Bioabbau unter denitrifizierenden Bedingungen reduziert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird aus der Molekülformel der Prüfverbindung und der Stöchiometrie des anoxischen Bioabbaus dieser Verbindung berechnet (vereinfacht, ohne Biomasse) und als Milligramm der Produktion von Nitrat-Stickstoff je Milligramm der Prüfverbindung angegeben.

3.15

Voradaptation

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

4 Kurzbeschreibung

Zur Untersuchung des anoxischen Abbaus wird die Stickstoff-Produktion (N_2) über eine Druckmessung in einem geschlossenen System verfolgt.

Ein sauerstofffreies, nitrathaltiges Mineralsalzmedium mit der Prüfschubstanz als einzige Kohlenstoff-Quelle wird in eine druckfeste Flasche eingebracht, mit Inokulum aus dem Denitrifikationsbecken einer Kläranlage beimpft; der Gasraum der Flasche ist mit Argon oder Stickstoff zu begasen, um den Zutritt von Sauerstoff zu verhindern. Anschließend wird das Gefäß mit einem Druckmesskopf verschlossen. Die Verwendung von KOH oder NaOH ist vorteilhaft, wenn über eine Titration das absorbierte CO_2 zu messen ist, um daraus eine Kohlenstoffbilanz zu erstellen.

Die Druckzunahme in der Flasche ist daher dem bei der Denitrifikation entstehenden Stickstoff proportional. Die Druckmesswerte einer Probe werden mittels Drucksensoren erfasst und aufgezeichnet und können jederzeit auf einen PC übertragen werden. Die analytische Bestimmung des Gehalts an NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ und Protein zu Beginn und am Ende des Versuchs ermöglicht eine Stickstoffbilanz, die Auskunft über die Plausibilität der Ergebnisse und insbesondere die Dichtigkeit des Systems gibt. Erfahrungsgemäß sind die entstehenden Konzentrationen der Metaboliten NO und N_2O nur sehr niedrig und können daher vernachlässigt werden.

Der Grad des Bioabbaus unter anoxischen Bedingungen wird durch den Vergleich zwischen tatsächlicher und theoretischer Stickstoff-Produktion bestimmt und in Prozent angegeben. Das Prüfergebnis ist der aus der Plateauphase der Bioabbaukurve bestimmte maximale Grad des Bioabbaus. Wahlweise kann eine Kohlenstoffbilanz berechnet werden, um zusätzliche Informationen zum Bioabbau zu erhalten und die Bewertung des Bioabbaus zu verbessern (siehe C.2).

5 Geräte und Materialien

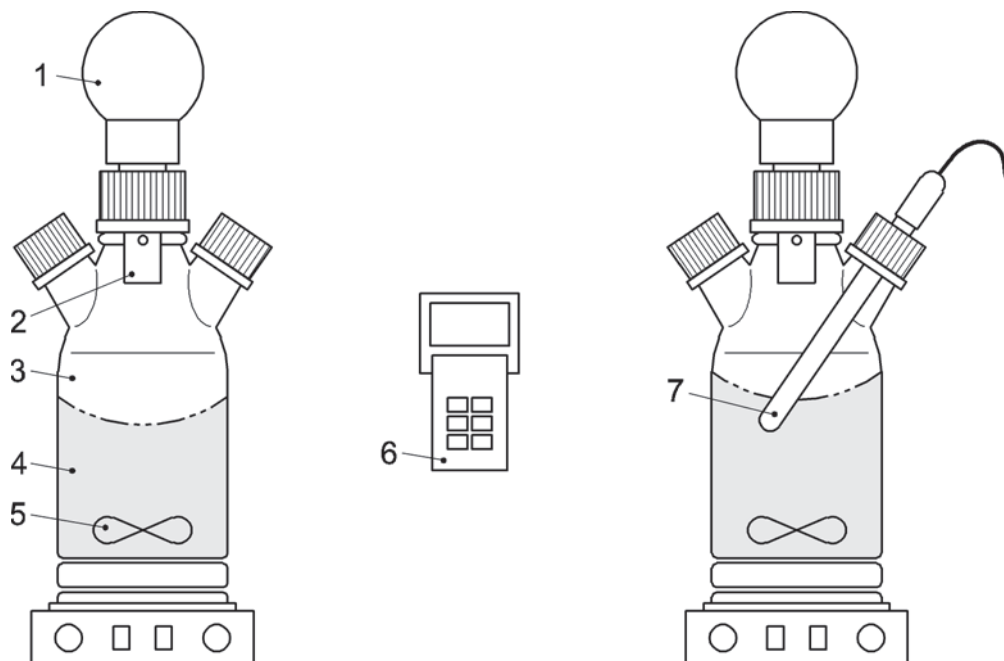
5.1 Druckmesssystem

Das Prinzip eines Systems zur Messung des produzierten Stickstoffs mittels Druckmessung wird an folgendem Beispiel dargestellt.

Druckmesssystem¹ (siehe Bild 1) bestehend aus:

- Druckmessköpfe, eine Kombination aus einem Schraubverschluss mit integriertem Drucksensor;
- druckfest verschließbare Flaschen als Reaktionsgefäße, Nennvolumen: 500 ml (oder 1 000 ml) mit seitlichem, druckfest verschließbarem Glasstutzen;
- Sorptionsgefäße für die CO_2 -Sorption in den Reaktionsgefäßen.

1 Das OxiTop Control System der Firma WTW, Weilheim, Deutschland, bestehend aus „OxiTop®-C“-Druckmessköpfen, Sorptionsgefäßen, passenden Flaschen und Zubehör, ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Bei diesem System werden die Druckmesswerte einer Probe fortlaufend in den OxiTop-Köpfen aufgezeichnet. Dabei wird der Wert beim Start der Prüfung automatisch auf den Umgebungsdruck (Relativ-Null) gesetzt. Die Steuerung der Köpfe (z. B. Modus, Start, Messdauer, GLP-Überwachung, usw.) erfolgt über einen Controller (OxiTop® OC110) mittels Infrarot-Schnittstelle. Die aktuellen Druckmesswerte können jederzeit abgefragt, am Display angezeigt und über ein PC-Programm weiter bearbeitet werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.



Legende

- 1 Druckmesskopf mit IR-Schnittstelle
- 2 Sorptionsgefäß für CO₂-Sorption
- 3 Gasraum-Volumen (V_{Gas})
- 4 Reaktionsgefäß mit Prüfansatz (Medium, Prüfsubstanz und Inokulum)
- 5 Magnetrührer
- 6 Steuerungsgerät mit IR-Schnittstelle
- 7 pH-Elektrode (optionale Variante mit pH-Messung)

Bild 1 — Druckmesssystem für die Messung des biologischen Abbaus unter anoxischen Bedingungen (Beispiel)

5.2 Rührplattform oder einzelne Magnetrührer

Es sollten Rührplattformen oder Magnetrührer² mit möglichst geringer Wärmeabgabe verwendet werden. Die Temperatur in den Prüfgefäßen sollte weitestgehend konstant bleiben, da sich Temperaturschwankungen sehr stark auf die Messergebnisse auswirken.

5.3 Raum oder Inkubator mit konstanter Temperatur von $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$

Der Inkubator³ sollte den Temperatursollwert möglichst genau halten, da sich Temperaturschwankungen sehr stark auf die Messergebnisse auswirken.

5.4 Argon zur Entfernung von Sauerstoff aus Medium und Gasraum

Argon 5.0, Reinheit > 99,999 % ist zu verwenden.

² Die Rührplattform IS 6-Var der Firma WTW, Weilheim, Deutschland, für sechs Prüfgefäße ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

³ Die Thermostatschränke der Firma WTW, Weilheim, Deutschland, sind ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

5.5 Thermometer

Ein Thermometer dient zum Messen der Temperatur des Inokulums und zum Nachprüfen der eingestellten Temperatur im Inkubator.

5.6 Membranfilter

Die folgenden Membranfilter werden zur Bestimmung von suspendierten Stoffen verwendet:

- Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite 0,45 µm);
- Cellulosenitrat-Membranfilter (Porenweite 0,45 µm).

5.7 Belebtschlamm aus dem Denitrifikationsbecken einer Kläranlage

5.8 KOH oder NaOH für Sorption

Es wird eine frisch hergestellte wässrige Standardlösung mit einer Konzentration von 5 mol/l verwendet⁴ (Bezeichnung: „Original-KOH“ bzw. „Original-NaOH“).

5.9 HCl für Titration

Es wird eine frisch hergestellte wässrige Standardlösung mit einer Konzentration von 1 mol/l verwendet⁵.

5.10 pH-Messgerät mit Elektroden⁶

5.11 Chemikalien, Pipetten, Pipettenspitzen

5.12 Photometrische Küvettentests

Es sind handelsübliche Produkte⁷ zu verwenden.

4 Natronlauge (bzw. Kalilauge), Titrisol®, Merck, Darmstadt, Deutschland ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

5 Salzsäure, Titrisol®, Merck, Darmstadt, Deutschland ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

6 Multi 340i, WTW, Weilheim, Deutschland ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

7 Photometrische Küvettentests der Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte.

Nitrat-Stickstoff: NO_3^- -N LCK 340 (Messbereich 5 mg/l bis 35 mg/l NO_3^- -N)

LCK 339 (Messbereich 0,23 mg/l bis 13,5 mg/l NO_3^- -N)

Ammonium-Stickstoff: $(\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3)$ -N LCK 302 (Messbereich 47 mg/l bis 130 mg/l NH_4^+ -N),

LCK 303 (Messbereich 2 mg/l bis 47 mg/l NH_4^+ -N)

Nitrit-Stickstoff: NO_2^- -N LCK 341 (Messbereich 0,015 mg/l bis 0,6 mg/l NO_2^- -N)

LCK 342 (Messbereich 0,6 mg/l bis 6,0 mg/l NO_2^- -N)

Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

Bei LCK 304 beeinflusst die pH-Pufferung der Probe den pH-Wert der Analysenlösung zu stark, was zu falschen Werten führt. Daher sollte dieser Küvetten-Test nicht verwendet werden.

5.13 Photometer für die Verfahren oder Küvettentests

5.14 Analysenwaage

Es ist eine Waage mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg zu verwenden.

6 Vorbereitung

6.1 Bestimmung der Volumina der jeweiligen Reaktionsgefäße

Die Reaktionsgefäße werden zunächst leer gewogen, dann mit entgastem destilliertem Wasser luftblasenfrei gefüllt und wieder gewogen. Aus der Differenz der Massen und der Dichte des Wassers bei der entsprechenden Temperatur (siehe entsprechende Tabellen) kann das Gesamtvolumen berechnet werden. Das Gasraumvolumen ergibt sich aus der Differenz des Gesamtvolumens und des Volumens der flüssigen Phase des jeweiligen Versuchsansatzes. Außerdem wird dieses Gasvolumen durch eingebrachte Teile, z. B. Magnetührstab, Absorptionsgefäß, KOH- oder NaOH-Standardlösungen, verringert.

6.2 Probenvorbereitung

Prüfsubstanzen sind in einem Trockenschrank (bei 105 °C) zu trocknen. Substanzen mit niedrigem Schmelzpunkt sind bei Raumtemperatur trocknen zu lassen und im Exsikkator aufzubewahren. Unlösliche Prüfsubstanzen sind als Pulver (möglichst mit definiertem Korngrößenbereich) oder Folienstückchen (möglichst mit definierter Dicke und Abmessungen) zu verwenden (z. B. nach ISO 10210).

6.3 Vorbereitung des Mediums

6.3.1 Reagenzien

Alle Reagenzien müssen analysenrein sein.

6.3.2 Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Das Wasser (z. B. Qualität 3 nach ISO 3696) muss frei von toxischen Substanzen (insbesondere Kupfer) sein und einen DOC-Gehalt von weniger als 2 mg/l aufweisen.

6.3.3 Herstellung der Konzentrate

Das Medium ist an das „optimierte Prüfmedium“ der aeroben Abbauversuche angelehnt (nach EN ISO 14851) und enthält wie dieses einen starken Phosphatpuffer, um den pH-Wert während des Abbauvorgangs nahezu konstant zu halten. Dies ist bei der Denitrifikation noch wichtiger als bei aeroben Prozessen, da nach der Stöchiometrie der Gleichung (1) je mol reduziertem NO_3^- 1 mol OH^- entsteht. Abweichend von dem in aeroben Abbauversuchen verwendeten „optimierten Prüfmedium“ wird für die Bakterien hier kein NH_4^+ , dafür aber NaNO_3 als einzige N-Quelle zur Verfügung gestellt. Da Eisen in einem wichtigen Enzym der Denitrifikation enthalten ist, werden etwa 0,8 mg/l Fe^{2+} als FeSO_4 (stabilisiert mit EDTA) sowie weitere Spurenelemente zugegeben (siehe Tabelle 1). Die maximale Menge an Prüfsubstanz unter Standardbedingungen sollte etwa 100 mg nicht überschreiten, kann aber abhängig von den Bedingungen nach Anhang A variiert werden.

Die Konzentrate, Lösung A bis Lösung E, sind bei 4 °C bis 10 °C längere Zeit haltbar, nur Lösung F muss täglich frisch hergestellt werden.

6.3.3.1 Lösung A

Es werden

a) wasserfreies Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) 37,5 g,

b) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 87,3 g

in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.3.3.2 Lösung B

Es werden 22,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.3.3.3 Lösung C

Es werden 36,4 g Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.3.3.4 Lösung D

Es werden 303,4 g NaNO_3 in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt (diese Lösung enthält 50 g/l NO_3^- -N).

6.3.3.5 Lösung E (Spurenelementlösung SL6)⁸

Es werden

— $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 g,

— $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g,

— H_3BO_3 0,30 g,

— $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,20 g,

— $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g,

— $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g,

— $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g

in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

⁸ SL6 ist eine Empfehlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) [3], Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Deutschland.

6.3.3.6 Lösung F (SL4)⁹

Es werden

— $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g,

— Ethylendiamintetraessigsäure ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) 0,5 g,

in Wasser (siehe 6.3.2) gelöst und

— Lösung E (SL6) 100 ml

hinzugefügt und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.3.4 Vorbereitung des Mediums

Um 1 l Prüfmedium herzustellen, werden 100 ml der Lösung A und jeweils 1 ml der Lösungen B und C zu etwa 500 ml Wasser (siehe 6.3.2) hinzugefügt. Weiterhin werden 6 ml der Lösung D (für etwa 300 mg/l NO_3^- -N), je nach zu erwartender Nitratreduktion können auch andere Nitratkonzentrationen eingestellt werden (siehe Anhang A), und dann 20 ml der Lösung F hinzugefügt. Anschließend wird mit Wasser (siehe 6.3.2) auf 1 000 ml aufgefüllt.

Durch Messen des pH-Wertes, der $7,0 \pm 0,2$ betragen sollte, kann die ordnungsgemäße Zusammensetzung des Prüfmediums überprüft werden.

Das Medium wird anschließend mindestens 1 h unter Vakuum (erzeugt z. B. durch eine Flüssigkeitsstrahl-Vakuumpumpe) gerührt und dann mit Ar (oder N_2) begast, bis eine Sauerstoff-Konzentration von unter 0,05 mg/l gemessen wird (Sauerstoffelektrode). Der Vorteil von Ar gegenüber N_2 besteht darin, dass die Dichte höher ist als die von Luft und es dadurch als Schutzschicht auf dem Medium liegt.

6.4 Vorbereitung des Inokulums

Die Nitratkonzentration im Belebtschlamm aus dem Ablauf des Denitrifikationsbeckens einer Kläranlage, mit einem Gehalt an suspendierten Stoffen zwischen 3 g/l und 6 g/l, wird auf etwa 100 mg/l NO_3^- -N eingestellt (z. B. mit 1 ml der Lösung D je 500 ml Belebtschlamm). Die Anpassung an die Inkubationstemperatur erfolgt mindestens 3 h (jedoch höchstens 24 h) in einem verschlossenen Gefäß und unter gelegentlichem Rühren.

Zur Bestimmung der suspendierten Stoffe wird aus dem gerührten Belebtschlamm ein bestimmtes Volumen (z. B. 10 ml) schnell abpipettiert und über ein vorher getrocknetes und gewogenes Membranfilter (m_1), Porenweite 0,45 μm , filtriert. Nach Trocknung bei $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ (etwa 2 h) und Abkühlenlassen in einem Exsikkator auf Raumtemperatur wird das Membranfilter wieder ausgewogen (m_2). Die Differenz ($m_2 - m_1$) dividiert durch das Volumen der filtrierten Wasserprobe ergibt die Konzentration der suspendierten Stoffe.

⁹ SL4 ist eine Empfehlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) [3], Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Deutschland.

7 Durchführung der Versuche

7.1 Beginn der Prüfung

Beim Start der Prüfung muss sichergestellt werden, dass Medium und Reaktionsgefäße möglichst sauerstofffrei sind. Deshalb werden Vorratsflasche und Reaktionsgefäße vor und während des gesamten Füllvorgangs bis zum Verschließen der Gefäße mit Ar begast.

Zur Sorption des während der Inkubation entstehenden CO₂ werden etwa 5 g Natronkalk in die Absorbergefäße eingefüllt. Wenn eine C-Bilanz zu erstellen ist, werden die Absorbergefäße stattdessen mit je 5 ml KOH (Original-KOH) mit einer Konzentration von 5 mol/l gefüllt. Diese Menge reicht aus für die Sorption von maximal 13 mmol CO₂.

ACHTUNG — Um den Prüfvorgang nicht zu stören, darf die KOH- oder NaOH-Lösung das Medium nicht verunreinigen.

Die Prüfsubstanzen bzw. die Referenzsubstanz (Positivreferenz zur Prüfung des Inokulums, siehe Tabelle 1) werden zuerst (genau) eingewogen und in die Reaktionsgefäße mit Magnetrührstab gegeben. Das vorbereitete Medium wird unter Ar-Begasung hinzugefügt (z. B. mit einem Flaschenaufsatzdispenser) und zum Schluss wird das vorbereitete Inokulum (Volumenanteil: 5 % des Gesamtvolumens der Flüssigkeit, Konzentration an suspendierten Stoffen im Prüfansatz: 150 mg/l bis 300 mg/l) hinzugefügt. Bei den Blindwerten wird keine Prüfsubstanz zugegeben. Mindestens drei Reaktionsgefäße je Prüfsubstanz, Referenzsubstanz und Blindwert sollten eingesetzt werden.

Für Screeningzwecke dürfen zwei Kolben für Prüfmateri al, Blindprobe und Referenzmateri al anstelle von drei verwendet werden.

Die Referenzsubstanz sollte unter denitrifizierenden Bedingungen gut und schnell abbaubar sein. Als Referenzsubstanz wird PHB (Poly-β-hydroxybuttersäure) in Pulverform empfohlen. Sowohl für die Prüfsubstanz als auch für die Referenzsubstanz wird eine Korngrößenverteilung empfohlen, deren Partikelgröße einen oberen Grenzwert von 250 µm nicht überschreitet.

Die Reaktionsgefäße werden sofort nach der Befüllung mit den Schraubverschlüssen auf den seitlichen Stutzen und Druckmessköpfen fest verschlossen (gutes Festdrehen ist sehr wichtig). Bei Reaktionsgefäßen mit geeigneten seitlichen Anschlüssen können auch pH- und/oder Sauerstoffelektroden integriert werden. In diesem Fall sollte das Gesamtvolumen der wässrigen Phase auf etwa 400 ml erhöht werden, damit die Sensoren in die Flüssigkeit eintauchen. Für diesen Fall sollte die Einwaage der Untersuchungsprobe nach Anhang A berechnet werden.

Falls weitere Informationen über den Abbauvorgang gewonnen werden sollen, kann in einem oder mehreren Reaktionsgefäßen die Entwicklung des pH-Wertes verfolgt werden. Die pH-Elektroden müssen dazu druckdicht in den Flaschen eingepasst sein. Sie werden jeweils mit einem pH-Messgerät verbunden. Dieses muss mit einem Messwertspeicher (Datenlogger) ausgerüstet sein und eine Übertragung dieser Werte zu einem PC ermöglichen. In diesem Fall muss das Volumen der Elektrode bei der Bestimmung des Gasraumvolumens des jeweiligen Reaktionsgefäßes berücksichtigt werden.

Die Reaktionsgefäße werden in einen Inkubator (oder Raum) mit einer konstanten Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gebracht und auf einem Magnetrührer sanft gerührt. Da die Temperaturanpassung in den Reaktionsgefäßen je nach Temperaturdifferenz einige Stunden dauern kann und sich dabei der Druck ändert, sollte die Messung erst nach Stabilisierung der Temperatur gestartet werden (Beginn der Messung)¹⁰. Alternativ dazu kann die Druckmessung auch im Labor gestartet werden und die Reaktionsgefäße können dann in den Inkubator eingebracht werden. Dies muss bei der Auswertung berücksichtigt und entsprechende Korrekturwerte müssen zu den Druckwerten addiert werden.

Bei der Analytikprobe (siehe Tabelle 1) wird wie bei den Blindwerten keine Prüfsubstanz zugefügt. Sie dient zur Bestimmung der Anfangskonzentrationen (siehe 7.2) und kann deshalb in einem beliebigen Gefäß hergestellt werden.

Tabelle 1 — Beispiel für eine Zugabe in die Reaktionsgefäße

Reaktionsgefäß — Bezeichnung	Blindwert ^a	Prüfsubstanz ^a	Referenzsubstanz ^a	Analytikprobe
Einwaage m , in mg	—	etwa 100	etwa 100	—
Volumen des Mediums, in ml	237	237	237	237
Volumen des Inokulums, in ml	13	13	13	13
Gesamtvolumen der flüssigen Phase, in ml	250	250	250	250
^a Es werden drei Parallelproben benötigt.				

7.2 Bestimmung der Anfangskonzentrationen (Analytikprobe)

7.2.1 Bestimmung des pH-Wertes

Die Bestimmung erfolgt nach EN ISO 10523.

7.2.2 Bestimmung der suspendierten Stoffe des Inokulums

Die Bestimmung der suspendierten Stoffe des Inokulums muss nach EN 872:2005 erfolgen.

Zur Sicherstellung einer gut durchmischten Suspension sollte die Probe vor dem Pipettieren gut gerührt werden. Ein genau abgemessenes Volumen (z. B. 50 ml) der Analytikprobe wird über ein zuvor gewogenes Celluloseacetat-Membranfilter (Porenweite $0,45\ \mu\text{m}$) filtriert. Das Membranfilter mit dem Rückstand wird etwa 2 h im Trockenschrank bei etwa 105°C getrocknet, im Exsikkator (mindestens 30 min) abgekühlt und gewogen. Das Filtrat kann für die Bestimmung von Ammonium, Nitrit und Nitrat verwendet werden. Zur Bestimmung der Masse wird eine Analysenwaage empfohlen.

¹⁰ Beim WTW OxiTop Control System ist die maximale Anzahl von Datenpunkten je Druckmesskopf auf 360 begrenzt. Mit Einstellung der Versuchsdauer ändern sich damit automatisch die Messintervalle, bei einer Versuchsdauer von 60 d ergibt sich ein Messintervall von 4 h, was nach Erfahrungswerten ausreichend ist. Bei eventuell längeren Versuchszeiten können die Druckmessköpfe während der Inkubation nach der Datenübertragung neu gestartet werden, siehe Handbuch vom WTW OxiTop Control System.

7.2.3 Bestimmung von Ammonium-Stickstoff, Nitrit-Stickstoff und Nitrat-Stickstoff (für eine Stickstoff-Bilanz)

Die Bestimmung kann zum Beispiel nach DIN 38406-5 (Ammonium-Stickstoff) [4], EN 26777 (Nitrit) und DIN 38405-9 (Nitrat) [5] oder nach den Anleitungen der einschlägigen Küvettentests mit den entsprechenden Photometern erfolgen (siehe 5.12).

ANMERKUNG Die starke pH-Pufferung des Mediums kann eventuell das Messergebnis für Ammonium beeinflussen.

7.2.4 Proteinbestimmung (für eine Stickstoff- und Kohlenstoff-Bilanz)

Für die Proteinbestimmung (als Maß für die Bakterienbiomasse) werden 5 ml Suspension der Analytikprobe über ein Membranfilter (Celluloseacetat-Membranfilter, Porenweite 0,45 µm) filtriert und das Membranfilter mit dem Rückstand bis zur Analyse in einem verschlossenen Gefäß eingefroren. Zur Sicherstellung einer gut durchmischten Suspension sollte die Probe vor dem Pipettieren gut gerührt werden. Die Bestimmung erfolgt nach Lowry (Sperandio und Püchner, 1993) [6].

7.2.5 DOC-Bestimmung (für eine Kohlenstoff-Bilanz)

Für die DOC-Bestimmung werden 50 ml der Analytikprobe über ein Membranfilter (Celluloseacetat-Membranfilter, Porenweite 0,45 µm) filtriert. Die Bestimmung des DOC erfolgt aus dem Filtrat nach EN 1484.

7.3 Inkubationsperiode

Die gemessenen und aufgezeichneten Druckwerte sollten von Zeit zu Zeit aus den Druckmessköpfen auf den System-Controller bzw. PC übertragen werden. Damit kann der Fortschritt des Abbaus kontrolliert und verfolgt werden. Außerdem sollte die Temperatur im Inkubator überwacht werden, da das System auch auf kleine Temperaturschwankungen sehr empfindlich reagiert.

7.4 Ende der Prüfung

Wenn keine Zunahme des Drucks mehr festgestellt werden kann oder die maximale Versuchsdauer von 56 d erreicht ist, wird der Versuch beendet (in Übereinstimmung mit EN 14987). Die Flaschen werden vorsichtig geöffnet (KOH, NaOH oder Natronkalk dürfen nicht in Kontakt mit dem Medium kommen) und die gleichen Parameter bestimmt wie zu Beginn der Prüfung (7.2), mit Ausnahme der Konzentration der suspendierten Stoffe.

Die Konzentration der suspendierten Stoffe sollte wegen eines möglichen Abriebs der Magnetrührstäbchen nicht zur Messung der Biomasse herangezogen werden.

7.5 Bestimmung des in den Absorptionsgefäßen absorbierten CO₂ (für eine Kohlenstoff-Bilanz)

Die Bestimmung des in den Absorbergefäßen gebundenen CO₂ kann z. B. durch eine Titration erfolgen. Dazu werden die Absorbergefäße vorsichtig von den Köpfen getrennt und die Lösung mit einer Pipette in ein Titriergefäß überführt. Mit destilliertem Wasser wird nachgespült und auf ein ausreichendes Volumen für die Titration aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung sollte 11,5 nicht unterschreiten, da sonst die CO₂-Sorptionskapazität nicht mehr ausreichend wäre. Die Durchführung der Titration erfolgt mit HCl ähnlich wie die Bestimmung der Säurekapazitäten bis zu den pH-Werten 8,2 und 4,3 zum Beispiel nach DIN 38409-7 [7].

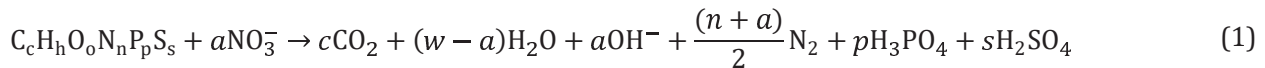
Die Auswertung der ermittelten Titrationskurven erfolgt nach C.1.

ANMERKUNG Das im Absorptionsgefäß gebundene Kohlenstoffdioxid kann auch unter Anwendung eines DOC-Analysegerätes als gelöster anorganischer Kohlenstoff (DIC) bestimmt werden.

8 Berechnung und Auswertung

8.1 Berechnung der theoretischen N₂-Produktion

Die stöchiometrische Gleichung der Denitrifikation einer Prüfsubstanz C_cH_hO_oN_nP_pS_s (vereinfacht für Prüfsubstanzen, die nur aus C, H, O, N, P und S bestehen, ohne Berücksichtigung von Biomasse und NO₂⁻-Produktion) lautet:



Dabei ist

c, h, o, n, p, s Bezugnahme auf die Indices der chemischen Formel der Prüfsubstanz, siehe Gleichung (1).

Aus der Stöchiometrie dieser Gleichung können die Faktoren *a* und *w* wie folgt ermittelt werden:

$$a = 0,2 \times (4c + h - 2o + 5p + 6s) \text{ und } w = \frac{1}{5} \times (2c + 3h - 1o - 5p - 2s) \quad (2)$$

Die theoretische N₂-Produktion (ThNP) kann damit wie folgt berechnet werden:

$$ThNP = \frac{Mr(N_2) \times (n + a)}{Mr \times 2} \text{ in mg N}_2/\text{mg Substrat} \quad (3)$$

Dabei ist

Mr(N₂) die Molmasse von N₂ (28,014 mg/mmol);

Mr die Molmasse der Prüfsubstanz, in mg/mmol.

BEISPIEL Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) mit der Summenformel: [C₄H₆O₂]_n (*n* = Anzahl der Monomereinheiten)

$$c = 4, h = 6, o = 2, Mr = 4 \times 12 + 6 \times 1 + 2 \times 16 = 86$$

$$ThNP = \frac{28,014 \times 0,2 \times (4 \times 4 + 6 - 2 \times 2)}{86 \times 2} = \frac{0,586 \text{ mg N}_2}{\text{mg}} \text{ Prüfsubstanz}$$

Für Prüfsubstanzen ohne N kann bei fehlender Kenntnis der Zusammensetzung ersatzweise der ThNP aus dem theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD) (berechnet aus dem gemessenen COD) berechnet werden. In diesem Fall ist:

$$ThNP = ThND = 0,35 \times ThOD \quad (4)$$

8.2 Berechnung der aktuellen N₂-Produktion

Die kontinuierliche Bestimmung des Druckanstiegs im Reaktionsgefäß erlaubt die Berechnung der jeweils aktuellen N₂-Produktion (der Anteil an gelöstem N₂ in Wasser beträgt nach Henry'schem Gesetz nur 1 % und ist daher vernachlässigbar; der Anteil an gelöstem N₂O allerdings 31 %), da CO₂ im Sorptionsgefäß absorbiert wird.

Aus dem idealen Gasgesetz abgeleitet kann die Masse des in den Prüfansätzen mit der Prüfsubstanz zum Zeitpunkt t $m(\text{N}_2)_t$ produzierten Stickstoffs wie folgt berechnet werden:

$$m(\text{N}_2)_t = \frac{(p_t - p_0) \times V_{\text{Gas}} \times Mr(\text{N}_2)}{R \times T} \text{ in mg} \quad (5)$$

Dabei ist

- p_t der Druck zum Zeitpunkt t , in hPa;
- p_0 der Druck zu Beginn der Messung, in hPa;
- V_{Gas} das Gasraum-Volumen, in ml (siehe A.1);
- $Mr(\text{N}_2)$ die Molmasse von $\text{N}_2 = 28,014 \text{ mg/mmol}$;
- R die allgemeine Gaskonstante $= 83,145 \text{ l hPa/(K}\cdot\text{mmol)}$;
- T die Temperatur in K $= \vartheta(^{\circ}\text{C}) + 273,15$.

Die virtuelle Konzentration des elementaren Stickstoffs N_2 ($\beta(\text{N}_2)$) wird definiert als:

$$\beta(\text{N}_2)_t = \frac{m(\text{N}_2)_t}{V_{\text{fl}}} \text{ in mg/l N} \quad (6)$$

Dabei ist

- $\beta(\text{N}_2)_t$ keine tatsächlich vorliegende Konzentration, sondern die Masse von N_2 -Gas (im Gasraum) dividiert durch das Volumen der flüssigen Phase V_{fl} . Dieser Parameter wird zum Vergleich mit Konzentrationen von gelöstem Stickstoff, wie z. B. NO_3^- -N, berechnet;
- $m(\text{N}_2)_t$ die Masse des in den Prüfansätzen mit der Prüfsubstanz zum Zeitpunkt t produzierten Stickstoffs;
- V_{fl} Volumen der flüssigen Phase, in l.

8.3 Berechnung des Abbaugrades bezogen auf die Stickstoffproduktion

Der prozentuale Abbaugrad D_t bezogen auf die Stickstoffproduktion unter anoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt t wird aus der Masse produzierten Stickstoffs der Prüfsubstanz $m(\text{N}_2)_t$ der theoretischen Nitratproduktion ThNP und der Einwaage der Prüfsubstanz m berechnet:

$$D_t = \frac{(m(\text{N}_2)_t - m(\text{N}_2)_{\text{Bt}}) \cdot 100}{\text{ThNP} \cdot m} \text{ in \%} \quad (7)$$

Dabei ist

- m die Einwaage der Prüfsubstanz, in mg;
- $m(\text{N}_2)_{\text{Bt}}$ die durchschnittliche Masse produzierten Stickstoffs der Blindwertproben zum Zeitpunkt t , in mg/l.

Der Abbaugrad bezogen auf die Stickstoffproduktion berücksichtigt nur den Anteil des Nitrat-Stickstoffs, der in gasförmigen Stickstoff überführt wird. Für die Bestimmung des Gesamtabbaugrades siehe C.3.