

DIN EN ISO 14851



ICS 83.080.01

Entwurf

Einsprüche bis 2016-08-24
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 14851:2004-10

**Bestimmung der vollständigen aeroben Bioabbaubarkeit von
Kunststoff-Materialien in einem wässrigen Medium –
Verfahren mittels Messung des Sauerstoffbedarfs in einem geschlossenen
Respirometer (ISO/DIS 14851:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 14851:2016**

Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium –

Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer (ISO/DIS 14851:2016);
German and English version prEN ISO 14851:2016

Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux –
Méthode par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé
(ISO/DIS 14851:2016);

Version allemande et anglaise prEN ISO 14851:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-06-24 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 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 ISO 14851:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 61 „Plastics“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 249 „Kunststoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NBN (Belgien) gehalten wird.

Das zuständige deutsche 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 der prEN ISO 14851 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die im Abschnitt 2 angegebenen Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 8245	siehe	DIN EN 1484
ISO 9408	siehe	DIN EN ISO 9408
ISO 10634	siehe	DIN EN ISO 10634

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 14851:2004-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) in Abschnitt 2 wurde das Jahr der Veröffentlichung von ISO 9408 eingefügt und die Fußnote entfernt;
- b) die übrigen Fußnoten wurden neu nummeriert;
- c) im Anhang C wurden Fehler in der Legende von Bild C.1 korrigiert und kleine Verbesserungen am Bild selbst vorgenommen;
- d) Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN 1484, Wasseranalytik — Anleitungen zur Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC); Deutsche Fassung EN 1484:1997

DIN EN ISO 9408, Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wässrigen Medium über die Bestimmung des Sauerstoffbedarfs in einem geschlossenen Respirometer; Deutsche Fassung EN ISO 9408:1999

DIN EN ISO 10634, Wasserbeschaffenheit — Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium; Deutsche Fassung EN ISO 10634:1995

— Leerseite —

**Bestimmung der vollständigen aeroben Bioabbaubarkeit von Kunststoff-Materialien in einem wässrigen Medium — Verfahren mittels Messung des Sauerstoffbedarfs in einem geschlossenen Respirometer
(ISO/DIS 14851:2016)**

Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux — Méthode par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé (ISO/DIS 14851:2016)

Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer (ISO/DIS 14851:2016)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Prüfumgebung	10
6 Reagenzien	10
6.1 Destilliertes oder deionisiertes Wasser	10
6.2 Prüfmedium	10
6.2.1 Standardprüfmedium	10
6.2.2 Optimisiertes Prüfmedium	11
6.3 Pyrophosphat-Lösung	12
6.4 Kohlendioxid-Absorber	12
7 Prüfeinrichtung	12
8 Durchführung	13
8.1 Prüfsubstanz	13
8.2 Referenzsubstanz	14
8.3 Herstellung des Inokulums	14
8.4 Ablauf der Prüfung	15
9 Berechnung und Auswertung	16
9.1 Berechnung	16
9.2 Auswertung und Angabe der Ergebnisse	17
10 Gültigkeit der Ergebnisse	18
11 Prüfbericht	18
Anhang A (informativ) Theoretischer Sauerstoffbedarf (ThOD)	20
A.1 Berechnung des ThOD	20
A.2 Beispiel: Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB)	20
A.3 Beispiel: Gemisch aus Polyethylen/Stärke/Glycerol	20
Anhang B (informativ) Korrektur der BOD-Werte um die Störung durch Nitrifikation	21
B.1 Einfluss der Nitrifikation	21
B.2 Beispiel	22
Anhang C (informativ) Prinzip eines geschlossenen manometrischen Respirometers	23
Anhang D (informativ) „Two-phase closed bottle“-Version der respirometrischen Prüfung	25
D.1 Kurzbeschreibung	25
D.2 Spezialausrüstung	25
D.3 Durchführung	25
D.4 Berechnung	26

Anhang E (informativ) Beispiel für die Bestimmung einer Kohlenstoffbilanz	28
E.1 Kurzbeschreibung	28
E.2 Durchführung der Prüfung	28
E.3 Berechnung der Kohlenstoffbilanz	29
E.4 Beispiel: Kohlenstoffbilanz für Poly-b-hydroxybutyrat	29
Anhang F (informativ) Beispiel der Bestimmung der am Ende einer Bioabbauprüfung zurückbleibenden Menge an nicht-wasserlöslichem Polymer und der molekularen Masse des Polymers	30
Anhang G (informativ) Beispiel für die Bestimmung des im Absorbens absorbierten Kohlenstoffs	31
G.1 Kurzbeschreibung	31
G.2 Durchführung der Prüfung	31
G.3 Berechnung	31
Literaturhinweise	33

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 14851:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 61 „Plastics“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 249 „Kunststoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NBN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 14851:2004 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 14851:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 14851:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 61, *Plastics*, Subcommittee SC 5, *Physical-chemical properties*.

Die Anhänge A bis H dieser Internationalen Norm dienen lediglich der Information.

Diese zweite Ausgabe löst die erste Ausgabe (ISO 14851:1999) ab, die technisch überarbeitet wurde und folgende Änderungen enthält:

- in Abschnitt 2 wurde das Jahr der Veröffentlichung von ISO 9408 eingefügt und die Fußnote entfernt;
- die übrigen Fußnoten wurden neu nummeriert;
- in Anhang C wurden Fehler in der Legende von Bild C.1 korrigiert und kleine Verbesserungen am Bild selbst vorgenommen;
- in den Literaturhinweisen wurden die Verweise [1] und [2] aktualisiert.

Einleitung

Mit der immer stärker zunehmenden Verwendung von Kunststoffen ist deren Rückgewinnung und Entsorgung zu einem Thema mit größter Bedeutung geworden. Oberste Priorität sollte hierbei der Rückgewinnung zugewiesen werden. Eine vollständige Rückgewinnung von Kunststoffen ist jedoch schwierig. So ist es beispielsweise schwierig, den zumeist von den Verbrauchern stammenden Kunststoffabfall vollständig rückzugewinnen. Weitere Beispiele für Kunststoffe, deren Rückgewinnung mit Schwierigkeiten verbunden ist, sind Angelgeräte, Kunststoff-Mikroperlen in Körperpflegeprodukten und wasserlösliche Polymere. Diese Kunststoffe neigen dazu, aus geschlossenen Abfallbehandlungskreisläufen herauszufallen und in die Umwelt zu gelangen. Derzeit werden bioabbaubare Kunststoffe entwickelt, die eine Möglichkeit zur Lösung solcher Umweltprobleme darstellen. Kunststoffe, wie z. B. Produkte oder Verpackungen, mit denen Kompostiereinrichtungen beschickt werden, sollten potentiell bioabbaubar sein. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die potentielle Bioabbaubarkeit solcher Materialien zu bestimmen und Erkenntnisse zu deren Bioabbaubarkeit in natürlichen Umgebungen zu erlangen.

WARNUNG — Abwasser, Belebtschlamm, Boden und Kompost können Organismen enthalten, die potentiell pathogen sind. Daher sollten bei deren Handhabung die entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Toxische Prüfverbindungen und Verbindungen, deren Eigenschaften nicht bekannt sind, sollten mit Vorsicht gehandhabt werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren fest, mit dem durch Messung des Sauerstoffbedarfs in einem geschlossenen Respirometer der Grad der aeroben Bioabbaubarkeit von Kunststoffen, einschließlich solcher Kunststoffe, die Formulierungs-Additive enthalten, bestimmt werden kann. Die Prüfsubstanz wird in einem wässrigen Medium unter Laborbedingungen einem Inokulum aus Belebtschlamm ausgesetzt.

Wird ein nicht adaptierter Belebtschlamm als Inokulum verwendet, werden durch die Prüfung die Bioabbauprozesse simuliert, die in einer natürlichen wässrigen Umgebung auftreten; wird ein gemischtes oder voradaptiertes Inokulum verwendet, kann das Verfahren dazu dienen, die potentielle Bioabbaubarkeit einer Prüfsubstanz zu untersuchen.

Die in dieser Internationalen Norm angewendeten Bedingungen entsprechen nicht notwendigerweise den optimalen Bedingungen, die das Auftreten eines maximalen Bioabbaus zulassen; die Norm ist für die Bestimmung der potentiellen Bioabbaubarkeit von Kunststoffen bzw. dafür vorgesehen, Erkenntnisse hinsichtlich deren Bioabbaubarkeit in natürlichen Umgebungen zu liefern.

Das Verfahren lässt durch die Berechnung einer Kohlenstoffbilanz (wahlweise, siehe Anhang E) die Verbesserung der Beurteilung der Bioabbaubarkeit zu.

Das Verfahren ist auf folgende Substanzen anwendbar:

- natürliche und/oder synthetische Polymere, Copolymere oder Gemische aus diesen;
- Kunststoffe, die Additive, wie z. B. Weichmacher, Farbstoffe oder andere Verbindungen, enthalten;
- wasserlösliche Polymere;
- Substanzen, die unter Prüfbedingungen die im Inokulum vorhandenen Mikroorganismen nicht inhibieren. Inhibierungswirkungen können durch eine Inhibierungskontrolle oder ein anderes geeignetes Verfahren bestimmt werden (siehe z. B. ISO 8192 [3]). Wirkt die Prüfsubstanz inhibierend auf das Inokulum, kann eine geringere Prüfkonzentration, ein anderes oder ein voradaptiertes Inokulum verwendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 8245:1999, *Water quality — Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)*

ISO 9408:1999, *Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer*

ISO 10634:1995, *Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium*

ISO/TR 15462:1997, *Water quality — Selection of tests for biodegradability*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1
vollständiger aerober Bioabbau
Zersetzung einer organischen Verbindung zu Kohlendioxid, Wasser und mineralischen Salzen jeglicher sonstiger vorliegender Elemente (Mineralisierung) sowie neuer Biomasse durch Mikroorganismen in der Gegenwart von Sauerstoff

3.2
Belebtschlamm
Biomasse, die bei der aeroben Behandlung von Abwasser durch das Wachstum von Bakterien und weiteren Mikroorganismen in der Gegenwart von gelöstem Sauerstoff entsteht

3.3
Konzentration an suspendierten Feststoffen in einem Belebtschlamm
die Menge an Feststoffen, die entsteht, wenn ein bekanntes Volumen an Belebtschlamm filtriert oder zentrifugiert und bei etwa 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet wird

3.4
biochemischer Sauerstoffbedarf
BOD
Massekonzentration an gelöstem Sauerstoff, die unter festgelegten Bedingungen durch die aerobe biologische Oxidation einer chemischen Verbindung oder organischen Substanz in Wasser verbraucht wird, angegeben als Milligramm der Aufnahme an Sauerstoff je Milligramm oder Gramm der Prüfverbindung

3.5
theoretischer Sauerstoffbedarf
ThOD
die theoretisch maximale Menge an Sauerstoff, die benötigt wird, um eine chemische Verbindung vollständig zu oxidieren; er wird aus der Molekülformel berechnet und als Milligramm der Aufnahme an Sauerstoff je Milligramm oder Gramm der Prüfverbindung angegeben

3.6
gesamter organischer Kohlenstoff
TOC
Kohlenstoffmenge, die in einer organischen Verbindung gebunden ist

3.7
gelöster organischer Kohlenstoff
DOC
der Teil des organischen Kohlenstoffs in Wasser, der durch ein festgelegtes Phasentrennverfahren, beispielsweise durch Zentrifugation bei 40 000 ms⁻² für 15 min oder durch Membranfiltration mit Membranen, deren Porendurchmesser 0,2 µm bis 0,45 µm beträgt, nicht abgetrennt werden kann

3.8
Lag-Phase
Verzögerungsphase
die 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

3.9

maximaler Grad des Bioabbaus

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

3.10

Bioabbauphase

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

3.11

Plateauphase

die in Tagen gemessene Zeit vom Ende der Bioabbauphase bis zum Ende der Prüfung

3.12

Voradaption

die 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

3.13

Vorkonditionierung

die 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 die Akklimatisierung der Mikroorganismen an die Prüfbedingungen zu verbessern

4 Kurzbeschreibung

Die Bioabbaubarkeit eines Kunststoffes wird mit aeroben Mikroorganismen in einem wässrigen System bestimmt. Das Prüfgemisch enthält ein anorganisches Medium, die organische Prüfsubstanz (als einzige Quelle für Kohlenstoff und Energie) mit einer Konzentration an organischem Kohlenstoff zwischen 100 mg/l und 2 000 mg/l sowie Belebtschlamm als Inokulum. Das Gemisch wird für eine Dauer, die 2 Monate nicht überschreiten darf, in einem Respirometer in geschlossenen Kolben gerührt. Das gebildete Kohlendioxid wird mit einem geeigneten Absorber im Luftraum (Headspace) der Kolben absorbiert. Der Sauerstoffbedarf (BOD) wird beispielsweise durch die Messung der zur Aufrechterhaltung eines konstanten Gasvolumens in den Respirometerkolben benötigten Sauerstoffmenge oder durch automatische oder manuelle Messung der Volumen oder Druckänderungen (oder einer Kombination beider) bestimmt. Ein Beispiel eines Respirometers ist in Anhang C aufgeführt. Alternativ kann die in ISO 10708 [4] beschriebene Version des Verfahrens mit zwei Phasen in geschlossener Flasche („Two-phase closed bottle“) verwendet werden (siehe Anhang D).

Der Grad des Bioabbaus wird durch den Vergleich zwischen BOD und theoretischem Bedarf (ThOD) bestimmt und in Prozent angegeben. Dabei ist der Einfluss möglicher Nitrifikationsvorgänge auf den BOD zu berücksichtigen. Das Prüfergebnis wird durch den aus der Plateauphase der Bioabbaukurve bestimmten maximalen Grad des Bioabbaus gebildet. Wahlweise kann eine Kohlenstoffbilanz berechnet werden, um zusätzliche Informationen zum Bioabbau zu erhalten (siehe Anhang E). Darüber hinaus kann auch der adsorbierte Kohlenstoff im Absorber am Ende der Prüfung bestimmt werden, um zusätzliche Informationen zum Bioabbau zu erhalten (siehe Anhang G).

Im Gegensatz zur ISO 9408, die für eine Reihe von organischen Verbindungen angewendet wird, ist die vorliegende Internationale Norm speziell für die Bestimmung der Bioabbaubarkeit von Kunststoffen vorgesehen. Die erforderlichen besonderen Anforderungen beeinflussen die Auswahl des Inokulums und des Prüfmediums, und es besteht die Möglichkeit, durch die Berechnung einer Kohlenstoffbilanz die Bewertung der Bioabbaubarkeit zu verbessern.

5 Prüfumgebung

Die Inkubation muss im Dunkeln oder in diffusem Licht in einem abgeschlossenen Raum erfolgen, der frei von Dämpfen ist, die die Mikroorganismen inhibieren, und dessen Temperatur konstant gehalten wird, vorzugsweise, auf ± 1 °C, bei 20 °C bis 25 °C oder bei einer beliebigen anderen, vom verwendeten Inokulum und der zu beurteilenden Umgebung abhängigen, Temperatur.

6 Reagenzien

Es dürfen nur Reagenzien mit anerkannter Analysenreinheit verwendet werden.

6.1 Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Destilliertes oder deionisiertes Wasser, das frei von toxischen Substanzen (insbesondere Kupfer) ist und weniger als 2 mg/l DOC enthält.

6.2 Prüfmedium

In Abhängigkeit vom Zweck der Prüfung dürfen unterschiedliche Prüfmedien verwendet werden. So ist beispielsweise für die Simulierung einer natürlichen Umgebung das Standardprüfmedium (6.2.1) anzuwenden. Wird eine Prüfsubstanz mit höheren Konzentrationen verwendet, ist das optimierte Prüfmedium (6.2.2) mit höherer Pufferkapazität und erweitertem Nährstoffangebot zu verwenden.

6.2.1 Standardprüfmedium

6.2.1.1 Lösung A

Wasserfreies Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	8,5 g
wasserfreies Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	21,75 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	0,5 g

werden in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

ANMERKUNG Durch Messen des pH-Wertes, der 7,4 betragen sollte, kann geprüft werden, ob die Lösung ordnungsgemäß zusammengesetzt ist.

6.2.1.2 Lösung B

Es werden 22,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.1.3 Lösung C

Es werden 36,4 g Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.1.4 Lösung D

Es werden 0,25 g Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

Um Ausfällung zu verhindern, ist diese Lösung vor dem Gebrauch frisch zuzubereiten, oder es ist ein Tropfen konzentrierter Salzsäure (HCl) oder ein Tropfen wässriger Lösung von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) mit einer Konzentration von 0,4 g/l hinzuzufügen.

6.2.1.5 Herstellung

Um 1 Liter Prüfmedium herzustellen, werden

- 10 ml der Lösung A und
- jeweils 1 ml der Lösungen B bis D

zu etwa 500 ml Wasser (6.1) hinzugefügt. Es wird mit Wasser (6.1) auf 1 000 ml aufgefüllt. Das Prüfmedium ist vor der Verwendung frisch zuzubereiten. Die Lösungen A bis C dürfen bis zu 6 Monate im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert werden.

6.2.2 Optimiertes Prüfmedium

Dieses optimierte Medium ist stark gepuffert und hat einen höheren Gehalt an anorganischen Nährstoffen. Dies ist erforderlich, um den pH-Wert im System während der Prüfung, selbst bei hohen Konzentrationen der Prüfsubstanz, konstant zu halten. Das Medium enthält etwa 2 400 mg/l Phosphor und 50 mg/l Stickstoff und ist daher für Konzentrationen an organischem Kohlenstoff in der Prüfsubstanz von bis zu 2 000 mg/l geeignet. Werden höhere Konzentrationen der Prüfsubstanz verwendet, ist der Stickstoffgehalt zu erhöhen, so dass das C : N-Verhältnis bei etwa 40 : 1 bleibt.

6.2.2.1 Lösung A

Wasserfreies Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	37,5 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	87,3 g
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	2,0 g

werden in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.2.2 Lösung B

Es werden 22,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.2.3 Lösung C

Es werden 36,4 g Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.2.4 Lösung D

Es werden 0,25 g Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt (siehe zweiten Absatz von 6.2.1.4).

6.2.2.5 Lösung E (Spurenelementlösung, wahlweise)

In 10 ml einer wässrigen HCl-Lösung (25 %, 7,7 mol/l) werden folgende Substanzen in der angegebenen Reihenfolge gelöst:

70 mg ZnCl_2 ; 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 6 mg H_3BO_3 ; 190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 3 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 240 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 36 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 33 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 26 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

und es wird mit Wasser (6.1) auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.2.2.6 Lösung F (Vitaminlösung, wahlweise)

In 100 ml Wasser (6.1) sind folgende Substanzen zu lösen: 0,6 mg Biotin; 2,0 mg Niacinamid; 2,0 mg *p*-Aminobenzoat; 1,0 mg Pantothersäure; 10,0 mg Pyridoxalhydrochlorid; 5,0 mg Cyanocobalamin; 2,0 mg Folsäure; 5,0 mg Riboflavin; 5,0 mg Liponsäure und 1,0 mg Thiamindichlorid, oder es wird eine Lösung von 15 mg Hefeextrakt in 100 ml Wasser (6.1) verwendet. Zum Sterilisieren wird die Lösung durch Membranfilter (siehe 7.4) filtriert.

ANMERKUNG Die Lösungen E und F sind wahlfrei und nicht erforderlich, wenn eine ausreichende Konzentration des Inokulums verwendet wird, z. B. Belebtschlamm. Es wird empfohlen, Teilmengen von jeweils 1 ml herzustellen und diese bis zum Gebrauch gekühlt aufzubewahren.

6.2.2.7 Herstellung

Um 1 Liter Prüfmedium herzustellen, werden

- 100 ml der Lösung A und
- jeweils 1 ml der Lösungen B bis D und wahlweise der Lösungen E und F

zu etwa 800 ml hinzugefügt. Es wird mit Wasser (6.1) auf 1 000 ml aufgefüllt, und der pH-Wert wird gemessen.

ANMERKUNG Durch Messen des pH-Wertes, der $7,0 \pm 0,2$ betragen sollte, kann geprüft werden, ob das Prüfmedium ordnungsgemäß zusammengesetzt ist.

6.3 Pyrophosphat-Lösung

Es werden 2,66 g wasserfreies Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) in Wasser (6.1) gelöst, und es wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

6.4 Kohlendioxid-Absorber

Vorzugsweise Natronkalkpellets oder ein sonstiger geeigneter Absorber.

7 Prüfeinrichtung

Es ist sicherzustellen, dass alle Glasgeräte gründlich gereinigt und insbesondere frei von organischer oder toxischer Substanz sind.

Gefordert sind die üblichen Laborgeräte und Folgendes:

7.1 Geschlossenes Respirometer, einschließlich der Prüfgefäße (Glaskolben), die mit Rührern und jeglichem weiteren erforderlichen Zubehör ausgestattet sind, und das sich in einem Raum mit konstanter Temperatur oder in einer thermostatisch geregelten Apparatur (z. B. Wasserbad) befindet. Für ein Beispiel siehe Anhang C.

ANMERKUNG Es ist jedes Respirometer geeignet, das in der Lage ist, den biochemischen Sauerstoffbedarf mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen, vorzugsweise eine Apparatur, die den verbrauchten Sauerstoff automatisch und kontinuierlich misst und nachliefert, so dass während des Abbauvorganges kein Sauerstoffmangel und keine Inhibierung der mikrobiellen Aktivität auftritt. Anstelle eines gewöhnlichen Respirometers kann die Version der „Two-phase closed bottle“ (siehe Anhang D) angewendet werden.

7.2 Analytische Ausrüstung zur Messung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) (siehe ISO 8245).

7.3 Analytische Ausrüstung zur Messung der Nitrat- und Nitritkonzentrationen.

ANMERKUNG Es wird empfohlen, zuerst eine qualitative Prüfung durchzuführen, um entscheiden zu können, ob Nitrifikationsvorgänge aufgetreten sind. Falls Hinweise auf das Vorhandensein von Nitrat/Nitrit im Medium vorliegen, ist eine quantitative Bestimmung mit dem geeigneten Verfahren (beispielsweise Ionenchromatographie) erforderlich.

7.4 Zentrifuge oder Filtriervorrichtung mit Membranfiltern (0,45 µm Porengröße), die weder signifikante Mengen an organischem Kohlenstoff adsorbiert noch diese freisetzt.

7.5 Analysenwaage (übliche Laborausrüstung).

7.6 pH-Messgerät (übliche Laborausrüstung).

8 Durchführung

8.1 Prüfsubstanz

Die Masse der Prüfsubstanz muss bekannt sein, und diese Substanz muss ausreichend Kohlenstoff enthalten, dass sich ein BOD ergibt, der mit dem angewendeten Respirometer in angemessener Weise gemessen werden kann. Der ThOD (siehe Anhang A) und der TOC (z. B. durch Anwendung der ISO 8245) sind aus der Summenformel zu berechnen oder durch Elementaranalyse zu bestimmen. Die verwendete Konzentration der Prüfsubstanz muss mindestens 100 mg/l betragen, was einem ThOD von etwa 170 mg/l oder einem TOC von etwa 60 mg/l entspricht. Untere Konzentrationen dürfen nur bei ausreichender Empfindlichkeit des Respirometers verwendet werden. Die Höchstmenge der Prüfsubstanz wird durch die Sauerstoffzufuhr zum Respirometer und das verwendete Prüfmedium begrenzt. Bei der Anwendung des optimierten Prüfmediums (6.2.2) muss die Konzentration der Prüfsubstanz so sein, dass der TOC einen Wert von etwa 2 000 mg/l, d. h. ein C : N-Verhältnis von etwa 40 : 1, nicht überschreitet. Sind höhere Konzentrationen zu prüfen, muss die Menge an Stickstoff im Prüfmedium erhöht werden.

ANMERKUNG 1 Sind Bioabbauprozesse in natürlicher Umgebung zu simulieren, wird die Anwendung des Standardmediums und einer Konzentration der Prüfsubstanz von 100 mg/l empfohlen.

ANMERKUNG 2 Die Prüfsubstanz sollte vorzugsweise in Form von Pulver, kann jedoch auch als Filme, Stücke, Fragmente oder Formteile eingesetzt werden. Die Form und die Maße der Prüfsubstanz können deren Bioabbaubarkeit beeinflussen. Sind unterschiedliche Arten von Kunststoff zu vergleichen, sollten vorzugsweise ähnliche Formen verwendet werden. Wird die Prüfsubstanz in Pulverform eingesetzt, sollten Teilchen mit einer bekannten, in engen Grenzen liegenden Korngrößenverteilung verwendet werden. Es wird eine Korngrößenverteilung empfohlen, deren Höchstwert bei 250 µm liegt. Auch die Größe der verwendeten Prüfausrüstung kann von der Form der Prüfsubstanz abhängig sein. Es sollte sichergestellt werden, dass aufgrund der Prüfbedingungen, wie zum Beispiel aufgrund des eingesetzten Rührmechanismus, keine wesentlichen mechanischen Abweichungen auftreten. Die Aufbereitung der Prüfsubstanz (z. B. die Verwendung von Pulver im Falle von Verbundstoffen) sollte das Abbauverhalten der Substanz nicht signifikant beeinflussen. Wahlweise können der Gehalt an Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel sowie die Molekularmasse einer polymeren Prüfsubstanz aufgezeichnet werden, wozu beispielsweise die Ausschluss-Flüssigkeitschromatographie (Gelpermeationschromatographie) (siehe z. B. ASTM D 3536-91 [1] oder jedes sonstige anwendbare Standardverfahren) eingesetzt wird. Vorzugsweise sollten Kunststoffe ohne Additive, wie z. B. Weichmacher, geprüft werden. Sofern die Substanz solche Additive enthält, sind Informationen zu deren Bioabbaubarkeit erforderlich, um die Bioabbaubarkeit der polymeren Substanzen selbst beurteilen zu können.

Für Einzelheiten zum Umgang mit schwer wasserlöslichen Verbindungen siehe ISO 10634.

8.2 Referenzsubstanz

Als Referenzsubstanz ist/sind Anilin und/oder ein gut definiertes bioabbaubares Polymer zu verwenden (beispielsweise mikrokristallines Cellulosepulver, aschefreie Cellulosefilter oder Poly- β -hydroxybutyrat). Sofern dies möglich ist, sollten der TOC sowie die Form und die Größe mit den entsprechenden Eigenschaften der Prüfschubstanz vergleichbar sein.

Als Negativ-Kontrolle kann wahlweise ein nichtbioabbaubares Polymer (z. B. Polyethylen), dessen Form der der Prüfschubstanz entspricht, verwendet werden.

8.3 Herstellung des Inokulums

Als geeignete Quelle für das Inokulum hat sich Belebtschlamm aus einer Kläranlage erwiesen, in der überwiegend häusliches Abwasser behandelt wird. Das Inokulum entstammt einer aktiven aeroben Umgebung und ist aus einem geographisch umfangreichen Bereich verfügbar, in dem eine große Bandbreite an Kunststoffen geprüft werden muss. Ist der Bioabbau in einem bestimmten Abfallbehandlungssystem festzustellen, muss das Inokulum aus der entsprechenden Umgebung gewonnen werden.

Aus einer gut geführten Kläranlage oder einer Versuchskläranlage, in der hauptsächlich häusliche Abwässer behandelt werden, wird eine Belebtschlamm-Probe entnommen. Diese Probe wird gut durchmischt, unter aeroben Bedingungen gelagert und vorzugsweise am Tag der Entnahme verwendet (mindestens innerhalb von 72 h).

Vor Gebrauch ist die Konzentration der suspendierten Feststoffe zu ermitteln (z. B. nach ISO 11923 [5]). Falls erforderlich, ist der Schlamm durch Sedimentation aufzukonzentrieren, so dass das der Probe zugesetzte Schlammvolumen so gering wie möglich ist. Das zugesetzte Volumen muss ausreichen, um im endgültigen Gemisch suspendierte Feststoffe im Konzentrationsbereich von 30 mg/l bis 1 000 mg/l zu erhalten.

Ist die endogene Respiration des Inokulums zu hoch, muss es vor dem Gebrauch durch Begasung stabilisiert werden. Die Prüftemperatur muss an das eingesetzte Inokulum angepasst werden (siehe Anmerkung zu Abschnitt 5).

ANMERKUNG 1 Es kann sinnvoll sein, die koloniebildenden Einheiten (KBE) des verwendeten Inokulums zu bestimmen. Vorzugsweise sollte das Prüfgemisch etwa 103 KBE/ml bis 106 KBE/ml enthalten.

ANMERKUNG 2 Sind Bioabbauvorgänge in einer natürlichen Umgebung zu simulieren, oder ist eine Kohlenstoffbilanzbestimmung durchzuführen (siehe Anhang E), wird eine Konzentration von 30 mg/l an suspendierten Feststoffen für das Inokulum empfohlen. Da Feststoffe die Bestimmung der Kohlenstoffbilanz beeinflussen können, wird für die Herstellung des Inokulums folgendes Verfahren empfohlen. Es werden 500 ml Belebtschlamm entnommen und für 2 min bei mittlerer Drehzahl in einem Mischer oder in einem geeigneten Hochgeschwindigkeitsmischer homogenisiert. Der Schlamm wird stehen gelassen, um zu sedimentieren, bis die überstehende Flüssigkeit keine signifikanten Mengen an suspendierter Substanz mehr enthält, in jedem Fall jedoch für mindestens 30 min. Ein ausreichendes Volumen der überstehenden Flüssigkeit wird dekantiert und in die Prüfkolben gegeben, so dass sich im Prüfmedium eine Konzentration mit einem Volumenanteil von 1 % bis 5 % ergibt. Dabei muss vermieden werden, Schlammteilchen mit zu überführen.

ANMERKUNG 3 Ein Inokulum darf vorconditioniert werden; üblicherweise und insbesondere bei Standardprüfungen, bei denen das Bioabbauverhalten in natürlicher Umgebung simuliert wird, sollte jedoch kein voradaptiertes Inokulum verwendet werden. In Abhängigkeit vom Zweck der Prüfung darf auch ein voradaptiertes Inokulum verwendet werden, vorausgesetzt, dies wird im Prüfbericht klar angegeben (z. B. prozentualer Bioabbau bei Einsatz voradaptierter Inokula = x %) und das Verfahren der Voradaptation wird in diesem Bericht ausführlich beschrieben. Voradaptierte Inokula können aus den geeigneten Laborprüfungen zum Bioabbau (siehe ISO/TR 15462) gewonnen werden, die unter einer Reihe von unterschiedlichen Bedingungen ausgeführt wurden, oder aus Proben, die an Orten entnommen wurden, an denen die entsprechenden Umgebungsbedingungen vorliegen (z. B. kontaminierte Bereiche oder industrielle Aufbereitungsanlagen).

8.4 Ablauf der Prüfung

Es ist eine Reihe von Kolben bereitzustellen, so dass mindestens die folgenden Kolben für die Prüfung verwendet werden können:

- a) drei Prüfkolben für die Prüfsubstanz (Symbol F_T);
- b) drei Prüfkolben für den Blindwert (Symbol F_B);
- c) zwei Prüfkolben zur Überprüfung der Aktivität des Inokulums mit einer Referenzsubstanz (Symbol F_C).

Und, falls erforderlich:

- d) ein Kolben zur Überprüfung auf mögliche abiotische Abbauvorgänge oder nichtbiologische Veränderungen in der Prüfsubstanz, wie z. B. durch Hydrolyse (Symbol F_S). Die Prüflösung in F_S ist, beispielsweise durch Behandlung im Autoklaven oder durch Hinzufügen einer geeigneten anorganischen toxischen Verbindung, zu sterilisieren, um eine mikrobielle Aktivität zu verhindern. So können beispielsweise 5 ml/l einer Lösung, die 10 g/l an Quecksilber(II)-chlorid ($HgCl_2$) enthält, verwendet werden. Sofern erforderlich, wird während der Prüfung die gleiche Menge der toxischen Substanz hinzugefügt;
- e) ein Kolben für die Negativ-Kontrolle (Symbol F_N), der eine nichtbioabbaubare polymere Substanz (z. B. Polyethylen) enthält, deren Form der der Prüfsubstanz entspricht;
- f) ein Kolben, um auf mögliche inhibierende Wirkungen der Prüfsubstanz auf die mikrobielle Aktivität zu überprüfen (Symbol F_I). Es ist zu beachten, dass das Verhältnis des Kohlenstoffs in der Prüf- und der Referenzsubstanz zum Stickstoff im Medium mindestens bei etwa C : N = 40 : 1 liegt. Sofern erforderlich, ist Stickstoff hinzuzufügen.

Nach Tabelle 1 sind geeignete Mengen des Prüfmediums (6.2) und des Inokulums (siehe 8.3) in die Prüfkolben zu geben.

Der pH-Wert in den Kolben wird gemessen und erforderlichenfalls auf 7 eingestellt. In die hierfür vorgesehene Aufnahme des Respirometers (siehe Anhang C) wird Kohlendioxid-Absorber (6.4) gegeben. Nach Tabelle 1 werden die Prüfsubstanz (siehe 8.1), die Referenzsubstanz und die Substanz für die Negativ-Kontrolle (siehe 8.2) in die entsprechenden Kolben gegeben. Ist eine Kohlenstoffbilanz zu bestimmen (siehe Anhang E), ist ein bekanntes und ausreichend großes Volumen des beimpften Prüfmediums aus jedem Kolben oder aus zusätzlichen separaten Kolben zu entnehmen, um zu Beginn und am Ende der Inkubationsperiode den DOC und die Biomasse zu bestimmen. Bei der Einstellung des endgültigen Volumens und bei der Berechnung der Prüfergebnisse ist das entnommene Volumen zu berücksichtigen.

Die Kolben werden in eine Umgebung mit konstanter Temperatur gegeben (siehe Abschnitt 5) und auf die gewünschte Temperatur gebracht. Sämtliche erforderlichen Verbindungen werden hergestellt, die Kolben werden verschlossen und in das Respirometer gegeben, und der Rührer wird in Gang gesetzt.

Es werden die erforderlichen Ablesungen an den Manometern (Druckmessgeräten) durchgeführt (bei manuellem Betrieb), und es wird überprüft, ob das Aufzeichnungsgerät für den Sauerstoffverbrauch ordnungsgemäß funktioniert (bei automatischem Respirometer). Alternativ kann die in Anhang D beschriebene Version der „Two-phase closed bottle“ verwendet werden.

Tabelle 1 — Endgültige Verteilung der Prüf- und Referenzsubstanzen

Kolben	Prüfsubstanz	Referenzsubstanz	Inokulum
F _T Prüfung	+	–	+
F _T Prüfung	+	–	+
F _T Prüfung	+	–	+
F _B Blindwert	–	–	+
F _B Blindwert	–	–	+
F _B Blindwert	–	–	+
F _C Überprüfung des Inokulums	–	+	+
F _C Überprüfung des Inokulums	–	+	+
F _S Überprüfung auf abiotischen Abbau (wahlweise)	+	–	–
F _I Inhibitionskontrolle (wahlweise)	+	+	+
F _N Negativ-Kontrolle (wahlweise)	–	+	+

Sobald ein konstanter Grad des BOD (Plateauphase) erreicht ist und kein weiterer Bioabbau erwartet wird, kann die Prüfung als abgeschlossen angesehen werden. Die maximale Prüfdauer beträgt 2 Monate. Im Falle langer Prüfungen ist besonders auf das technische System (z. B. die Dichtheit der Prüfgefäße und der Verbindungen) zu achten.

Unmittelbar nach Beendigung der Prüfung sind der pH-Wert zu messen und die Konzentrationen an Nitrat und Nitrit in den F_T-Kolben zu bestimmen (siehe Anmerkung), oder es sind Proben zu entnehmen, die in geeigneter Weise konserviert werden. Die Werte werden verwendet, um den berechneten Grad des Bioabbaus um die Wirkung der Nitrifikation zu korrigieren (siehe Anhang B).

ANMERKUNG Allylthioharnstoff kann nur bei kurzen Inkubationszeiten, die Nitrifikation inhibieren, da er selbst bioabbaubar ist. Daher wird vom Zusatz von Allylthioharnstoff zur Verhinderung der Nitrifikation abgeraten. Jedoch hat die Erfahrung gezeigt, dass bei geringen Konzentrationen des Inokulums (etwa ein Volumenanteil von 1 %) selbst bei langen Inkubationszeiten keine Nitrifikation auftritt, auch wenn kein Inhibitor verwendet wird.

Wahlweise kann zusätzlich das absorbierte Kohlendioxid im Absorber am Ender der Prüfung bestimmt werden (siehe Anhang G).

9 Berechnung und Auswertung

9.1 Berechnung

Für jeden Kolben ist nach dem vom Hersteller für den jeweiligen Respirometertyp angegebenen Verfahren der Sauerstoffverbrauch zu bestimmen. Der spezifische biochemische Sauerstoffbedarf (BOD_S) der Prüfsubstanz wird nach Gleichung (1) als Differenz zwischen dem Sauerstoffverbrauch in den Prüfkolben F_T und den Blindwertkolben F_B, dividiert durch die Konzentration der Prüfsubstanz berechnet:

$$BOD_S = \frac{BOD_t - BOD_{Bt}}{\rho_{TC}} \quad (1)$$

Dabei ist

BOD_S	der spezifische BOD, in Milligramm je Gramm Prüfsubstanz;
BOD_t	der BOD der Kolben F_T , die zum Zeitpunkt t die Prüfsubstanz enthalten, in Milligramm je Liter;
BOD_{Bt}	der BOD der Blindwertkolben F_B zum Zeitpunkt t , in Milligramm je Liter;
ρ_{TC}	die Konzentration der Prüfsubstanz im Reaktionsgemisch des Kolbens F_T , in Gramm je Liter.

Der prozentuale Bioabbau D_t wird nach Gleichung (2) als das Verhältnis des spezifischen biochemischen Sauerstoffbedarfs zum theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD, in Milligramm je Gramm Prüfsubstanz) berechnet:

$$D_t = \frac{BOD_S}{ThOD} \times 100 \quad (2)$$

Auf dieselbe Weise sind der BOD und der prozentuale Bioabbau der Referenzsubstanz F_C und, sofern zutreffend, der Substanz für die Überprüfung auf abiotischen Abbau F_S , der Inhibitionskontrolle F_I und der Negativkontrolle F_N zu berechnen.

ANMERKUNG Für die Berechnung des ThOD siehe Anhang A. Werden signifikante Konzentrationen an Nitrit und Nitrat bestimmt, ist auch der durch die Nitrifikation bedingte Sauerstoffbedarf zu berücksichtigen (siehe Anhang B). Ist eine Kohlenstoffbilanz zu berechnen, sind die in Anhang E angegebenen Informationen zu verwenden.

9.2 Auswertung und Angabe der Ergebnisse

Aus den gemessenen BOD-Werten und den prozentualen Werten des Bioabbaus für jedes Messintervall und jeden Prüfkolben ist eine Tabelle zu erstellen. Für jedes Gefäß sind eine BOD-Kurve und eine Kurve des prozentualen Bioabbaus als Funktion der Zeit zu erstellen. Werden für die dreifach vorhandenen Kolben jeweils vergleichbare Werte erzielt, kann eine mittlere Kurve erstellt werden.

Der als Mittelwert der Plateauphase der Bioabbaukurve bestimmte maximale Grad der Bioabbaubarkeit, bzw., z. B. wenn die Kurve abfällt oder später in der Plateauphase langsam ansteigt, der Höchstwert, stellt den Grad des Bioabbaus der Prüfsubstanz dar. Wurde eine Kohlenstoffbilanz erstellt, stellt das Ergebnis dieser Bestimmung den Gesamtgrad des Bioabbaus dar.

Die Benetzbarkeit und die Form der Prüfsubstanz können die erhaltenen Ergebnisse beeinflussen; daher ist das Prüfverfahren möglicherweise auf den Vergleich von Kunststoffen mit ähnlicher chemischer Struktur begrenzt.

Informationen zur Toxizität der Prüfsubstanz können bei der Auslegung von Prüfergebnissen, die auf eine geringe Bioabbaubarkeit hinweisen, von Nutzen sein.