

DIN EN ISO 18187



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von
Arthrobacter globiformis (ISO 18187:2016);
Deutsche Fassung EN ISO 18187:2018**

Soil quality –

Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* (ISO 18187:2016);

German version EN ISO 18187:2018

Qualité du sol –

Essai contact pour échantillons solides utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis* (ISO 18187:2016);

Version allemande EN ISO 18187:2018

Gesamtumfang 38 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 18187:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 18187:2018 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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

ISO 1773	siehe	DIN ISO 1773
ISO 5667-15	siehe	DIN EN ISO 5667-15
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 7027	siehe	DIN EN ISO 7027
ISO 10381-6	siehe	DIN ISO 10381-6
ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11268-2	siehe	DIN EN ISO 11268-2
ISO 11277	siehe	DIN ISO 11277
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465
ISO 15799	siehe	DIN ISO 15799

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-15, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 15: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Schlamm- und Sedimentproben*

DIN EN ISO 7027, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung*

DIN EN ISO 11260, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der effektiven Kationenaustauschkapazität und der Basensättigung unter Verwendung von Bariumchloridlösung*

DIN EN ISO 11268-2, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida/Eisenia andrei*

DIN ISO 1773, *Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyer-, Rund- und Stehkolben, enghalsig*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*

DIN ISO 10390^{*)}, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes*

DIN ISO 10694^{**)}, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse)*

DIN ISO 11277, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren mittels Siebung und Sedimentation*

DIN ISO 11465^{***)}, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse — Gravimetrisches Verfahren*

DIN ISO 15799, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien*

^{*)} DIN ISO 10390 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15933:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall und Boden — Bestimmung des pH-Werts“ angewendet werden.

^{**)} DIN ISO 10694 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15936:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall, Boden und Abfall — Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) mittels trockener Verbrennung“ angewendet werden.

^{***)} DIN ISO 11465 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15934:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall, Boden und Abfall — Berechnung des Trockenmassenanteils nach Bestimmung des Trockenrückstands oder des Wassergehalts“ angewendet werden.

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit —
Feststoffkontakttest unter Verwendung der
Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis*
(ISO 18187:2016)

Soil quality —
Contact test for solid samples using the dehydrogenase
activity of *Arthrobacter globiformis*
(ISO 18187:2016)

Qualité du sol —
Essai contact pour échantillons solides utilisant
l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis*
(ISO 18187:2016)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Februar 2018 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien und Material	9
5.1 Prüforganismen	9
5.2 Kontrollsubstrate	9
5.2.1 Allgemeines	9
5.2.2 Kontrolle für Böden	10
5.2.3 Kontrolle für Abfälle	10
5.3 Prüfsubstrate	10
5.4 Chemikalien	11
6 Geräte	14
7 Durchführung	15
7.1 Herstellung von Verdünnungen	15
7.2 Referenzsubstanz und Herstellung der Positivkontrolle	15
7.3 Durchführung des Kontakttests	15
7.3.1 Allgemeines	15
7.3.2 Belüftung	16
7.3.3 Deaktivierung	17
7.3.4 Herstellung des Inokulums	17
7.3.5 Bebrütung und Messung der Fluoreszenz	17
7.4 Störungen	18
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	18
8.1 Berechnung	18
8.1.1 Relative Fluoreszenz	18
8.1.2 Bestimmung des Prozentsatzes der Hemmung	18
8.2 Angabe der Ergebnisse	19
9 Gültigkeit der Prüfung	19
10 Statistische Analyse	20
11 Prüfbericht	20
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	22
Anhang B (informativ) Vorbereitung der Prüforganismen	29
Anhang C (informativ) Prüfung von chemischen Substanzen	31
Literaturhinweise	33

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 18187:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 18187:2018 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 18187:2016 wurde von CEN als EN ISO 18187:2018 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 190, *Soil quality*, Subcommittee SC 4, Biological methods.

Einleitung

Diese Internationale Norm beschreibt den miniaturisierten Feststoffkontaktversuch mit *Arthrobacter globiformis*, der die vorläufige Beurteilung von Feststoffen (d. h. Boden und Abfälle) innerhalb von 6 h ermöglicht. Das Prinzip des Versuchs beruht auf der Hemmung der Dehydrogenaseaktivität eines hinzugefügten Prüforganismus, die durch biologisch verfügbare toxische Substanzen in Boden- und Abfallproben hervorgerufen wird. Dies ist ein ökologisch relevanter Versuch, sofern eine ubiquitäre Bodenbakterienart mit einer hohen Affinität zu Oberflächen verwendet wird [16], [6], deren Dehydrogenasen an verschiedenen biologischen Mechanismen beteiligt sind, die die Unversehrtheit der Bakterien erfordern (z. B. Atmungsketten). Außerdem wurde festgestellt, dass dieser Parameter (Hemmung der Dehydrogenaseaktivität) recht empfindlich gegenüber toxischen Substanzen ist [19], [10], [14], [15].

Insgesamt ist dieser Versuch nicht arbeitsaufwändig, schnell, kostengünstig und empfindlich, wobei Ergebnisse erhalten werden, die die physikalische und chemische Beurteilung natürlicher Proben verbessern, indem sie eine schnelle Identifizierung der biologischen Auswirkungen ermöglichen.

Der miniaturisierte Feststoffkontaktversuch beruht auf dem in Literaturhinweis [7] festgelegten Feststoffkontaktversuch.

Diese Internationale Norm beruht außerdem auf Literaturhinweis [23].

Die Ergebnisse eines Ringversuchs zur Bewertung der Prüfvariabilität zur Beurteilung verschiedener Abfall- und Bodenproben sowie Chemikalien sind in Anhang A angegeben.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Schnellverfahren zur Beurteilung von Feststoffproben in einer aeroben Suspension durch Bestimmung der Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* unter Verwendung des Redox-Farbstoffes Resazurin fest.

Sie gilt für die Beurteilung der Auswirkung von wasserlöslichen und feststoffgebundenen nicht flüchtigen Verunreinigungen in natürlichen Proben, wie Böden und Abfällen. Die Prüfung führt innerhalb von 6 h zu einem Ergebnis und kann deshalb zum Screening potentiell verunreinigten Materials eingesetzt 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 5667-15, *Water quality — Sampling — Part 15: Guidance on the preservation and handling of sludge and sediment samples*

ISO 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

CEN/TR 15310-1, *Charakterisierung von Abfall — Probenahme — Teil 1: Richtlinien zur Auswahl und Anwendung von Kriterien für die Probenahme unter verschiedenen Bedingungen*

EN 14735, *Charakterisierung von Abfällen — Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 Kontaktzeit

Dauer, für die die Bakterien einer Feststoffsuspension ausgesetzt sind

3.2 Negativkontrolle

Probe eines *Kontrollsubstrats* (3.6) mit einer Mischung bekannter Lösungen (destilliertes Wasser, Medium B oder *Inokulum* (3.12))

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird verwendet, um die Analyse zu standardisieren.

3.3 Positivkontrolle

Probe eines *Kontrollsubstrats* (3.6) mit einer Mischung bekannter Lösungen (destilliertes Wasser, Medium B oder *Inokulum* (3.12)) und einer Referenzsubstanz

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird verwendet, um die Empfindlichkeit des Prüforganismus zu überprüfen.

3.4 Blindprobe A

Blindprobe, die nach der Deaktivierung die Eigenfluoreszenz des Substrats angibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Blindprobe werden keine Bakterien hinzugefügt.

3.5

Blindprobe B

Blindprobe, die ohne Deaktivierung die natürliche Fluoreszenz des Substrats angibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Blindprobe werden keine Bakterien hinzugefügt.

3.6

Kontrollsubstrat

Referenz- oder Standardsubstrat, das als Kontrolle und als *Nährmedium* (3.13) zum Herstellen von Verdünnungs-/Konzentrationsreihen mit *Prüfsubstraten* (3.7) oder einer Referenzsubstanz verwendet wird

BEISPIEL Quarzsand oder LUFA-Standardboden Typ 2.2.

3.7

Prüfsubstrat

natürliches oder künstliches Substrat, das natürlich verunreinigt oder mit einer Prüfchemikalie aufgestockt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Prüfsubstrat ist das *Prüfgut* (3.8) nach der Vorbereitung für die Prüfung (z. B. gesiebt) und/oder mit einem *Kontrollsubstrat* (3.6) verdünnt.

3.8

Prüfgut

ursprüngliche Probe des Bodens oder Abfalls, ohne Änderungen (z. B. zu sieben)

3.9

Dehydrogenaseaktivität

Aktivität wasserstoffabspaltender Enzyme, die an vielen Energie- und Biosynthese-Stoffwechselprozessen (z. B. in der Atmungskette) beteiligt sind und die Integrität der Zelle erfordern

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Enzyme können in der extrazellulären Umgebung Resazurin zu Resorufin reduzieren [6].

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [21].

3.10

Wirkungskonzentration für eine Wirkung von x %

EC_x

Konzentration (Masseanteil) einer Prüfsubstanz oder Probe, die x % einer Wirkung an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer gegebenen Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle verursacht

BEISPIEL Eine EC₅₀ ist eine Konzentration, die eine Wirkung auf 50 % der exponierten Population an einem Endpunkt der Prüfung über eine festgelegte Kontaktzeit verursacht.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die EC_x wird als ein Prozentwert des geprüften Bodens oder Abfalls je Trockenmasse Bodenmischung angegeben. Wenn Chemikalien geprüft werden, wird die EC_x als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des Bodens in Milligramm je Kilogramm angegeben.

3.11

gefriergetrocknete Bakterien

Bakterienkultur, die durch das Entfernen von Wasser aus einer gefrorenen Zellsuspension durch Sublimation unter Unterdruck konserviert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die konservierten Kulturen können bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ gelagert werden. Nach der Rekonstitution (Wiederherstellung) mit sterilisiertem destilliertem Wasser [20 min bis 30 min bei $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$] sind die Bakterien aktiv und gebrauchsfertig für die Prüfung (siehe 7.3.4 b)).

3.12

Inokulum

Bakteriensuspension zum Beimpfen eines Nährmediums

3.13

Nährmedium

wässrige Nährstofflösung, die für das Bakterienwachstum notwendig ist

3.14

optische Dichte des Bakterieninokulums

Messung der Schwächung eines Lichtstrahls, der bei 600 nm durch eine Bakteriensuspension hindurchgeht (wird zur indirekten Bestimmung der Zellzahl angewendet)

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei einem Prüfverfahren mit Bakterien wird die Extinktion in der Regel in FAU (Formazin-Schwächungseinheiten; en: formazine attenuation units) bei 600 nm gemessen (siehe Literaturhinweis [3]).

3.15

Prüfbeginn

Zeitpunkt, an dem die Substrate, Reagenzien und das Bakterieninokulum (3.12) unmittelbar vor der Bebrütung und der Reaktionsdauer hergestellt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Fall bezieht sich das auf die Herstellung der Prüf- und Kontrollsubstrate (3.6) für die Bebrütung (d. h. Tabelle 1, Tag 0).

3.16

Reaktionszeit

Dauer der Enzymreaktion (von der Zugabe der Resazurin-Lösung bis zum Ende der Reaktion)

3.17

Anstieg

Verhältnis der Änderung der *relativen Fluoreszenz* (3.18) und der *Reaktionszeit* (3.16) zwischen 15 min und 45 min

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Anstieg (angegeben in min^{-1}) resultiert aus dem Anpassen eines linearen Regressionsmodells an Fluoreszenzmessungen über die Zeit.

3.18

relative Fluoreszenz

für jede Behandlung (Kontrolle und Prüfung) gemessene Fluoreszenz nach der Subtraktion der Fluoreszenz der zugehörigen *Blindprobe A* (3.4)

3.19

Stammkultur

Bakterienkultur, die aus der von einem zertifizierten Laboratorium bezogenen Reinkultur eines Stammes erhalten wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Stammkultur dient im Prüfverfahren als *Inokulum* (3.12) für die Vorkultur.

3.20

niedrigste unwirksame Verdünnung

LID-Wert

niedrigster Wert des Verdünnungsfaktors (LID), für den die Prüfung keine ökotoxikologisch relevante Reduzierung ergibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der LID-Wert wird als der reziproke Wert der Verdünnung angegeben.

BEISPIEL Eine häufig angewendete Verdünnungsreihe ist 1/2/4/8/16 [= 100 %/50 %/25 %/12,5 %/6,25 % Prüfsubstrat (3.7) zu Kontrollsubstrat (3.6)]. Ein LID-Wert von 8 entspricht einer Verdünnung von Boden oder Abfall von 1 : 8.