

DIN EN ISO 20130

ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit
kolorimetrischen Substraten in Mikrotiterplatten (ISO 20130:2018);
Deutsche Fassung EN ISO 20130:2020**

Soil quality –

Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates (ISO 20130:2018);

German version EN ISO 20130:2020

Qualité du sol –

Mesure de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats colorimétriques (ISO 20130:2018);

Version allemande EN ISO 20130:2020

Gesamtumfang 39 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 20130:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 20130:2020 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 „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 10390	siehe	DIN EN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 18400-206	siehe	DIN ISO 18400-206

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10390, *Boden, Schlamm und behandelter Bioabfall — Bestimmung des pH-Wertes*

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

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

DIN ISO 18400-206, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 206: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Beurteilung von biologischen funktionalen und strukturellen Endpunkten im Labor*

Deutsche Fassung

**Bodenbeschaffenheit —
Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit
kolorimetrischen Substraten in Mikrotiterplatten
(ISO 20130:2018)**

Soil quality —
Measurement of enzyme activity patterns in soil
samples using colorimetric substrates in micro-well
plates (ISO 20130:2018)

Qualité du sol —
Mesure de l'activité enzymatique dans des échantillons
de sol en utilisant des substrats colorimétriques
(ISO 20130:2018)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. April 2020 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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, Symbole und Abkürzungen	6
3.1 Begriffe	6
3.2 Symbole und Abkürzungen	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
5.1 Pufferlösungen und Reagenzien	7
5.2 Substrate und Standards	10
5.2.1 Herstellung von Standardlösungen	10
5.2.2 Herstellung von Substratlösungen	11
6 Geräte und Materialien	12
7 Durchführung	13
7.1 Erstellung von Kalibrierkurven	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 PNP-Lösung	13
7.1.3 β -Naphthylamin-Lösung	13
7.1.4 Ammoniumchlorid-Lösung	14
7.2 Probenahme	14
7.2.1 Probenvorbereitung	14
7.2.2 Substratzugabe	15
7.2.3 Extinktionsmessungen	17
7.2.4 Messungen von Urease-Aktivitäten	17
8 Berechnung der Ergebnisse	17
9 Angabe der Ergebnisse	18
10 Gültigkeitskriterien	18
11 Methodenvalidierung Ringversuch	19
12 Prüfbericht	19
Anhang A (informativ) Validierung des Verfahrens und Ringversuche zur Bewertung von Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren	20
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung von Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren	25
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 20130:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 20130:2020 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 November 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2020 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 Republik Nordmazedonien, 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 20130:2018 wurde von CEN als EN ISO 20130:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) 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. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO Dokumentenarten 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological characterization* erarbeitet.

Einleitung

Mikroorganismen sind für viele Schlüsselprozesse im Kreislauf der Elemente verantwortlich. Dabei sind Enzyme für den Abbau organischer Moleküle und deren Mineralisation verantwortlich. Die wichtigste Grundvoraussetzung ist, dass die Enzyme im Boden mikrobieller Herkunft sind, auch wenn Ausscheidungen von Pflanzenwurzeln Enzyme enthalten. Im Boden spielen extrazelluläre Enzyme eine wichtige Rolle beim biologischen Abbau organischer Makromoleküle. Die gemeinsame Aktivitätsbestimmung verschiedener Enzyme, die für den biologischen Abbau von organischen Verbindungen und die Mineralisation von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel im Boden wichtig sind, zeigt möglicherweise durch Chemikalien und andere anthropogene Einflüsse bedingte schädliche Auswirkungen auf. Allerdings können Enzymaktivitätsbestimmungen unter optimierten Laborbedingungen und unter Verwendung künstlicher Substrate nicht die tatsächlichen enzymatischen Umsatzraten in Böden *in situ* wiedergeben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur gemeinsamen (oder getrennten) Messung verschiedener Hydrolase-Aktivitäten (Arylamidase, Arylsulfatase, β -Galactosidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, saure, alkalische und globale Phosphatasen, Urease) in Bodenproben unter Verwendung von kolorimetrischen Substraten fest. Die Enzymaktivitäten im Boden variieren je nach Jahreszeit und sind abhängig von chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des Bodens.

Diese Methode kann entweder zum Nachweis schädlicher Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten im Boden durch toxische Substanzen oder andere anthropogene Stoffe in kontaminierten Böden gegenüber einem Kontrollboden oder zur Prüfung von Chemikalien angewendet werden.

2 Normative Verweisungen

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

ISO 18400-206, *Soil quality — Sampling — Part 206: Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

3 Begriffe, Symbole und Abkürzungen

3.1 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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>

3.2 Symbole und Abkürzungen

ARN	Arylamidase
ARS	Arylsulfatase
E.C.	Enzymklassifikationsnummer nach den Empfehlungen des Nomenklaturkomitees der Internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB)
NAG	N-Acetyl-Glucosaminidase
PAC	saure Phosphatase
PAK	alkalische Phosphatase
PHOS	Phosphatase
URE	Urease
β -GAL	β -Galactosidase
α -GLU	α -Glucosidase
β -GLU	β -Glucosidase

4 Kurzbeschreibung

In diesem Dokument wird ein Verfahren zur gemeinsamen Aktivitätsbestimmung verschiedener Enzyme in Bodenproben beschrieben (siehe Tabelle 1). Es beruht auf der Verwendung von Lösungen von Bodenproben und von kolorimetrischen Substraten, welche für festgelegte Zeiträume bei $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in Mikrotiterplatten inkubiert werden. Nach der Inkubation werden die Reaktionen gestoppt, die Platten zentrifugiert und die Überstände in neue Platten überführt. Die Färbungsintensitäten werden als Absorption mit einem 96-Well-Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen.

Tabelle 1 — Messungen der Enzymaktivität mit kolorimetrischem Verfahren

Enzym	Abkürzung	Nr.	Boden-kreislauf	abgebautes Makromolekül
Arylamidase	ARN	E.C. 3.4.11.2	Stickstoff	
Arylsulfatase	ARS	E.C. 3.1.6.1	Schwefel	Mineralisation von organischem Schwefel
β -Galactosidase	β -GAL	E.C. 3.2.1.22	Kohlenstoff	Hemicellulose
α -Glucosidase	α -GLU	E.C. 3.2.1.20	Kohlenstoff	Stärke und Glykogen
β -Glucosidase	β -GLU	E.C. 3.2.1.21	Kohlenstoff	Cellulose
N-Acetyl-Glucosaminidase	NAG	E.C. 3.2.1.52	Kohlenstoff	Chitin und andere β -1,4-gebundene Glucosamin-Polymere
Phosphatase	PHOS	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
Saure Phosphatase	PAC	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
alkalische Phosphatase	PAK	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
Urease	URE	E.C. 3.5.1.5	Stickstoff	Harnstoff

Zur Validierung der Norm wurde ein Ringversuch durchgeführt; eine Zusammenfassung des internationalen Ringversuchs ist in Tabelle 8 enthalten und die gesamten Daten der Ringversuche sind in Anhang B beschrieben.

5 Reagenzien

5.1 Pufferlösungen und Reagenzien

5.1.1 Allgemeines

Als Medium wird deionisiertes Wasser verwendet, um die natürlichen Bodenenzymaktivitäten bei dem pH-Wert des Bodens zu bewerten und auch die Analyse von mehreren Enzymen unter Verwendung derselben Bodensuspension zu ermöglichen. Das Verhältnis von Boden (in g) zu Wasser (in ml) (4 : 25) wird optimiert, um Reaktion und Empfindlichkeit zu maximieren und um die Pipettiertechnik zu erleichtern. Die Verwendung derselben Bodenlösung für die Analyse mehrerer Enzyme führt außerdem zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Arylamidase wird mit Tris-Pufferlösung, 50 mmol/l, pH-Wert 7,5 gemessen. Saure und alkalische Phosphatase werden hinzugefügt unter Verwendung von Tris HCl 50 mmol/l mit pH von 5,5 und Tris-Base 50 mmol/l mit pH 11.

ANMERKUNG Das Volumen kann bei Bedarf entsprechend angepasst werden.

5.1.2 Tris-Hydrochlorid, 50 mmol/l, pH-Wert $5,5 \pm 0,1$.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (CAS-Nr.: 1185-53-1 — M: 157,6): 7,88 g;
- deionisiertes Wasser: 1 000 ml;
- Salzsäure (HCl) (CAS-Nr. 7647-01-0), 1 mol/l.

7,88 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit Salzsäure (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Das Volumen wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lagerdauer darf bei (4 ± 2) °C in Glas- oder Polypropylenflasche einen Monat nicht überschreiten.

5.1.3 Tris-Base, 50 mmol/l, pH-Wert $11 \pm 0,1$.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — M: 121,14): 6,06 g;
- deionisiertes Wasser: 1 000 ml;
- Natriumhydroxid (CAS-Nr. 1310-73-2) (1 mol/l).

6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit Natriumhydroxid (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 11 eingestellt. Das Volumen wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lagerdauer darf bei (4 ± 2) °C einen Monat nicht überschreiten.

5.1.4 Tris-Base, 50 mmol/l, pH-Wert $7,5 \pm 0,1$.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — M: 121,14): 6,06 g;
- deionisiertes Wasser: 1 000 ml;
- Salzsäure (HCl) (CAS-Nr. 7647-01-0), 1 mol/l.

6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit Salzsäure (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Das Volumen wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lagerdauer darf bei (4 ± 2) °C einen Monat nicht überschreiten.

5.1.5 Tris-Base, 100 mmol/l, pH-Wert $12 \pm 0,1$.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — M: 121,14): 12,11 g;
- deionisiertes Wasser: 1 000 ml;
- Natriumhydroxid (CAS-Nr. 1310-73-2) (5 mol/l).

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit Natriumhydroxid (5 mol/l) auf einen pH-Wert von 12 eingestellt. Das Volumen wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lagerdauer darf bei (4 ± 2) °C einen Monat nicht überschreiten.

5.1.6 Calciumchlorid-Dihydrat, 0,5 mol/l

- Calciumchlorid-Dihydrat (CAS-Nr.: 10035-04-8 — M: 147,01): 14,7 g;
- deionisiertes Wasser: 200 ml.

14,7 g Calciumchlorid-Dihydrat werden in 200 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lagerdauer darf bei (4 ± 2) °C einen Monat nicht überschreiten.

5.1.7 Salicylat-Reagens

- Natriumsalicylat, 270 mmol/l (CAS-Nr.: 54-21-7 — M: 160,1): 865 mg
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 145 mmol/l (CAS-Nr.: 6132-04-3 — M: 294,1): 853 mg
- di-Natriumtartrat-Dihydrat, 60 mmol/l (CAS-Nr.: 6106-24-7 — M: 230,08): 276 mg
- Nitroprussid-Natrium-Dihydrat, 2 mmol/l (CAS-Nr.: 13755-38-9 — M: 297,95): 12 mg
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

Das Salicylat-Reagens wird unmittelbar vor der Analyse aus den vorstehend aufgeführten 4 Verbindungen hergestellt; 865 mg Natriumsalicylat, 853 mg tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 276 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat und 12 mg Nitroprussid-Natrium-Dihydrat werden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst.

5.1.8 Cyanurat-Reagens

- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 580 mmol/l (CAS-Nr.: 6132-04-3 — M: 294,1): 3,4 g
- di-Natriumtartrat-Dihydrat, 90 mmol/l (CAS-Nr.: 6106-24-7 — M: 230,08): 414 mg
- Lithiumhydroxid, 280 mmol/l (CAS-Nr.: 1310-65-2 — M: 23,95): 134 mg
- Natriumdichlorisocyanurat-Dihydrat 10 mmol/l (CAS-Nr.: 51580-86-0 — M: 255,98): 51 mg
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

Das Cyanurat-Reagens wird unmittelbar vor der Analyse aus den vorstehend aufgeführten 4 Verbindungen hergestellt; 3,4 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 414 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat, 134 mg Lithiumhydroxid und 51 mg Natriumdichlorisocyanurat-Dihydrat werden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst.

5.1.9 Ethanol, 96%ig

- Ethanol 96 %ig (CAS-Nr. 41340-36-7).

5.1.10 Angesäuertes Ethanol (0,26 mol/l HCl)

- Salzsäure, ACS-Reinheitsgrad (ACS: American Chemical Society), 37%ig (CAS-Nr. 7647-01-0) 4,32 ml;
- Ethanol, 96%ig (CAS-Nr. 41340-36-7).

4,32 ml konzentrierte HCl werden in 200 ml Ethanol, 96%ig, verdünnt. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.11 p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMCA) (3,5 mmol/l)

- DMCA (CAS-Nr.: 6203-18-5 — M:175,23): 0,12 g;
- Ethanol, 96%ig (CAS-Nr. 41340-36-7)

0,12 g DMCA werden in 200 ml Ethanol, 96%ig, gelöst. Die Lagerdauer darf bei $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ eine Woche nicht überschreiten.

Tabelle 2 — Einsatz von Pufferlösungen für die Messung der Enzymaktivitäten

	ARS, α -GLU, β -GLU, β -GAL, NAG, PHOS	ARN	URE	PAC	PAK
Boden- lösung	deionisiertes Wasser	Tris-Base, 50 mmol/l, pH 7,5	deionisiertes Wasser	Tris-HCl, 50 mmol/l, pH 5,5	Tris-Base, 50 mmol/l, pH 11
Stopp der Enzym- reaktion	Tris, 100 mmol/l, pH 12	Ethanol, 96%ig Angesäuertes Ethanol	Salicylat- Reagens	Trizma, 100 mmol/l, pH 12	
	CaCl ₂ 0,5 mol/l	DMCA	Cyanurat- Reagens	CaCl ₂ , 0,5 mol/l	

5.2 Substrate und Standards

5.2.1 Herstellung von Standardlösungen

5.2.1.1 Para-Nitrophenol (CAS-Nr.: 100-02-7 — PNP) mit einer Konzentration von 3,6 mmol/l

- para-Nitrophenol (PNP) (M: 139,11): 10 mg;
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

PNP in Pulverform sollte bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ und lichtgeschützt aufbewahrt werden. PNP wird sorgfältig eingewogen und in deionisiertem Wasser gelöst. Die Arbeitskonzentration beträgt 0,36 mM (d. h. Verdünnung der konzentrierten Lösung 1/10). Die Lagerdauer der konzentrierten Arbeitskonzentration darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten. Lösungen können für einen einmaligen Gebrauch oder maximal 3 Gefrier-/Auftauzyklen gleichmäßig aufgeteilt werden.

ANMERKUNG Paranitrophenol kann durch längere oder wiederholte Einwirkung beim Verschlucken (H373) Organe schädigen und bei Kontakt mit der Haut oder beim Einatmen (H302, H312 und H332) schädlich sein. Es müssen geeignete Lüftungs- und Schutzvorrichtungen verwendet werden.

5.2.1.2 Ammoniumchlorid (NH₄Cl) mit einer Konzentration von 62 mmol/l

- Ammoniumchlorid (CAS-Nr.: 12125-02-9 — M: 53,49): 66,4 mg;
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

Ammoniumchlorid in Pulverform kann lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Ammoniumchlorid wird sorgfältig eingewogen und in Wasser gelöst. Die konzentrierte Lösung sollte bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ für zwei Jahre aufbewahrt werden. Die Lagerdauer der konzentrierten Lösung darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten. Die Arbeitskonzentration beträgt 0,62 mmol/l (Verdünnung 1/100). Die Lagerdauer der Arbeitskonzentration darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten.

5.2.1.3 β -Naphthylamin, 1 mmol/l

- β -Naphthylamin (CAS-Nr.: 91-59-8 — M: 143,19): 35,8 mg;
- Ethanol, 96%ig: 20 ml;
- deionisiertes Wasser.