

DIN EN ISO 21479



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora –
Fettsäurezusammensetzung in Blättern zur Beurteilung der
Bodenbeschaffenheit (ISO 21479:2019);
Deutsche Fassung EN ISO 21479:2020**

Soil quality –

Determination of the effects of pollutants on soil flora –

Leaf fatty acid composition of plants to assess soil quality (ISO 21479:2019);

German version EN ISO 21479:2020

Qualité du sol –

Détermination des effets des polluants sur la flore du sol –

Composition en acides gras foliaires des plantes utilisées pour évaluer la qualité du sol
(ISO 21479:2019);

Version allemande EN ISO 21479:2020

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 21479:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 21479:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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

ISO 11269-1:2012	siehe	DIN EN ISO 11269-1:2013-03
ISO 11269-2:2012	siehe	DIN EN ISO 11269-1:2013-05
ISO 22030:2005	siehe	DIN EN ISO 22030:2011-09
ISO 29200:2013	siehe	DIN ISO 29200:2014-05

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 11269-1:2013-03, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung (ISO 11269-1:2012); Deutsche Fassung EN ISO 11269-1:2012*

DIN EN ISO 11269-2:2013-05, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saatauflauf und frühes Wachstum höherer Pflanzen (ISO 11269-2:2012); Deutsche Fassung EN ISO 11269-2:2013*

DIN EN ISO 22030:2011-09, *Bodenbeschaffenheit — Biologische Verfahren — Chronische Toxizität in höheren Pflanzen (ISO 22030:2005); Deutsche Fassung EN ISO 22030:2011*

DIN ISO 29200:2014-05, *Bodenbeschaffenheit — Beurteilung der genotoxischen Wirkungen auf höhere Pflanzen — Mikrokern-Prüfung mit *Vicia faba* (ISO 29200:2013)*

Deutsche Fassung

**Bodenbeschaffenheit —
Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf
die Bodenflora —
Fettsäurezusammensetzung in Blättern zur
Beurteilung der Bodenbeschaffenheit
(ISO 21479:2019)**

Soil quality —
Determination of the effects of pollutants
on soil flora —
Leaf fatty acid composition of plants
to assess soil quality
(ISO 21479:2019)

Qualité du sol —
Détermination des effets des polluants
sur la flore du sol —
Composition en acides gras foliaires des plantes
utilisées pour évaluer la qualité du sol
(ISO 21479:2019)

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 und Abkürzungen	6
3.1 Begriffe	6
3.2 Abkürzungen	7
4 Kurzbeschreibung des Verfahrens.....	7
5 Geräte und Reagenzien.....	7
5.1 Geräte.....	7
5.2 Reagenzien.....	8
6 Probenahmestrategien.....	8
7 Probenahme von Blattgewebe.....	9
8 Gewinnung, Extraktion und Analyse von Fettsäure-Methylestern (FAME)	9
8.1 Prüfung auf Verunreinigungen.....	9
8.2 Gewinnung und Extraktion von FAME aus Pflanzenblättern	9
8.3 Analyse der FAME.....	10
9 Prüfbericht.....	11
9.1 Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 21479	11
9.2 Beschreibung des Standorts und der analysierten Flächen	11
9.3 Blattprobenahme.....	12
9.4 Fettsäurezusammensetzung.....	12
9.5 Schlussfolgerung.....	12
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs.....	13
Anhang B (informativ) Beurteilung der Bodenbeschaffenheit durch Bestimmen des Omega-3-Index von <i>Lactuca-sativa</i> -Keimlingen, die <i>ex situ</i> unter kontrollierten Bedingungen gezogen werden.....	21
Anhang C (informativ) Pflanzenarten, die bereits erfolgreich zur Beurteilung der Böden von (durch organische Verbindungen und/oder Metalle) kontaminierten Standorten verwendet wurden.....	23
Anhang D (informativ) Veränderung des Omega-3-Index in Abhängigkeit von Entnahmezeit, Pflanzengröße und Blattentwicklung.....	24
Anhang E (informativ) Einfluss der Blattgewebemenge auf die FAME-Zusammensetzung.....	26
Anhang F (informativ) Beispiel für ein Chromatogramm, das bei der FAME-Analyse von Blattgewebe erhalten wurde.....	27
Anhang G (informativ) Empfohlenes mathematisches Verfahren zur Bewertung von Böden verschiedener Flächen, wenn einige der beprobten Pflanzenarten nicht auf allen Flächen vorkommen.....	28
Literaturhinweise.....	31

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21479:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 21479:2020 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 21479:2019 wurde von CEN als EN ISO 21479:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 Normungsthemen 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.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Von den mehr als 150 erarbeiteten ISO-Normen zur Bodenbeschaffenheit befassen sich weniger als 40 mit lebenden Organismen und darunter nur fünf mit höheren Pflanzen. Dabei ist es wichtig, die negativen Auswirkungen der Bodenbeschaffenheit auf lebende Organismen zu überwachen.

Eine dieser fünf Normen befasst sich mit der Genotoxizität [1], und die vier anderen befassen sich mit dem Saataufgang und/oder der Wachstumshemmung [2]-[5]. Damit konzentrieren sich diese Internationalen Normen offenbar entweder auf einen sehr spezifischen Effekt (Genotoxizität) oder auf Effekte, die groß genug sind, um mit der Entwicklung zusammenhängende (und damit sichtbare) Phänotypen (Saataufgang- oder Wachstumshemmung junger Keimlinge) in Böden, die im Freiland als Proben genommen wurden, hervorzurufen. Daher sind empfindlichere bzw. frühzeitigere Bioindikatoren für die negativen Auswirkungen von Schadstoffen auf Pflanzen erforderlich, wie etwa der „Omega-3-Index“.

Die Beurteilung der Auswirkung einer Bodenkontamination anhand des Omega-3-Index basiert auf der Zusammensetzung von Fettsäuren in Blättern von Angiospermenarten, die an problematischen Standorten wachsen. Der Omega-3-Index hat sich als geeignet erwiesen, das Vorhandensein von metallischen und organischen Kontaminanten (Herbiziden usw.) in Böden aufzuzeigen. Zu diesem Zweck sollten auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften (pH-Wert, N/P/K-Gehalt) der Böden bestimmt werden, denn die Fettsäurezusammensetzung der Pflanzen kann in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt variieren [12] und der pH-Wert kann die Bioverfügbarkeit chemischer Verbindungen beeinflussen. Es sollte beachtet werden, dass sich dieser Bioindikator als empfindlicher (d. h. auf niedrigere Dosen von Kontaminanten reagierend) erwiesen hat als die biometrischen Parameter Keimungsrate und Biomasse [6], [14]. Somit wird ermöglicht, Nachweise für negative Auswirkungen von Böden auf Pflanzen zu gewinnen, die anhand der Keimungsrate oder der Biomasse nicht aufgezeigt werden konnten. Zudem kann es bei einer Beurteilung *in situ* schwierig sein, offensichtliche Auswirkungen auf die Keimungsrate und/oder Biomasse von Pflanzen zu messen.

Es sollte beachtet werden, dass der Omega-3-Index aus praktischer Sicht insbesondere bei Pflanzenarten, die im Freiland geerntet werden, und im Vergleich zu anderen Bioindikatoren verschiedene Vorteile bietet.

- Für die Fettsäureanalyse werden nur 20 mg bis 50 mg frisches Blattgewebe je Probe benötigt. Dadurch werden die Pflanzen nicht zerstört, und es ist unproblematisch, auf einer bestimmten Fläche genügend Gewebe von einer Art zu erhalten.
- Proben von Pflanzengewebe können vor der Analyse mehrere Tage in Methanol bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- Es ist nicht erforderlich, an einem Standort eine bestimmte Art zu suchen, und grundsätzlich kann jede Art beprobt werden (wobei oft unter den repräsentativsten ausgewählt wird) (Abschnitt 6).

In Anhang A sind die Ergebnisse eines Ringversuchs dargestellt, der von sechs einzelnen Laboratorien durchgeführt wurde, um die Vergleichspräzision und die Wiederholpräzision des Verfahrens zu beurteilen. Die Ergebnisse, die jeweils von demselben Untersuchenden anhand derselben Probe und mit demselben Messgerät während eines kurzen Zeitraums erhalten wurden, sind in Anhang B dargestellt.

WARNUNG — Kontaminierte Böden können unbekannte Gemische von giftigen, mutagenen oder anderweitig schädlichen Chemikalien oder infektiösen Mikroorganismen enthalten. Durch Staub und verdunstete Chemikalien können Arbeitsschutzrisiken entstehen. Außerdem könnten Pflanzen Chemikalien aus dem Boden aufnehmen. Deshalb sollten beim Umgang mit den Prüfpflanzen entsprechende Sicherheitsmaßnahmen ergriffen werden.

1 Anwendungsbereich

Gegenstand dieses Dokuments ist ein Verfahren zum Vergleichen der Beschaffenheit von Böden durch Bestimmen der Fettsäurezusammensetzung in den Blättern von Pflanzen, die auf diesen Böden wachsen.

Dieses Verfahren ermöglicht keine Bestimmung des optimalen Werts des Omega-3-Index. Daher kann es nicht dazu verwendet werden, die intrinsische Qualität des Bodens auf einer bestimmten (als homogen angesehenen) Fläche zu bestimmen. Das Verfahren kann nur dazu verwendet werden, die Beschaffenheit von Böden auf verschiedenen Flächen miteinander zu vergleichen.

Das Verfahren ist anwendbar auf:

- Böden von kontaminierten Standorten;
- verbesserte Böden;
- Böden nach Altlastensanierungen;
- Böden, auf die Abfallprodukte (z. B. Flüssigmist, Gülle, Schlamm oder Kompost) aufgebracht wurden.

Alternativ kann die Beschaffenheit von Böden beurteilt werden, indem der Omega-3-Index von *Lactuca-sativa*-Keimlingen bestimmt wird, die in diesen Böden unter kontrollierten Bedingungen (d. h. in einer Wachstumskammer) gezogen werden, und diese Werte mit den bei Kontrollböden erhaltenen Werten verglichen werden (siehe Anhang B).

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe und Abkürzungen

3.1 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:

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

3.1.1

Omega-3-Index

$\% \text{ C18:3} / (\% \text{ C18:0} + \% \text{ C18:1} + \% \text{ C18:2})$

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Omega-3-Index ist einheitenlos.

3.2 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Abkürzungen.

FAME Fettsäure-Methylester; C16:0: Palmitinsäure-Methylester; C16:1: Palmitoleinsäure-Methylester;
C18:0: Stearinsäure-Methylester; C18:1: Oleinsäure-Methylester; C18:2:
Linolsäure-Methylester; C18:3: Linolensäure-Methylester.

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Das Verfahren dient zur Beurteilung der Beschaffenheit von Böden durch Bestimmen der Fettsäurezusammensetzung in Blättern verschiedener Arten von Angiospermen (Bedecktsamern) (siehe Anhang C und [9]-[14], [18]), die auf diesen Böden wachsen. Nach der Probenahme von Blattgeweben wird deren Fettsäurezusammensetzung bestimmt. Dazu werden die Blattgewebe einer Umesterung unterzogen, und die erhaltenen Fettsäure-Methylester werden gaschromatographisch analysiert. Nach der Analyse wird das Verhältnis $\% \text{C18:3} / (\% \text{C18:0} + \% \text{C18:1} + \% \text{C18:2})$ berechnet. Je niedriger dieses Verhältnis ist, desto stärker sind die durch den Boden verursachten negativen Auswirkungen auf Pflanzen [6] [9]-[14], [18].

5 Geräte und Reagenzien

5.1 Geräte

Zusätzlich zur üblichen Laborausrüstung sind die folgenden Geräte erforderlich.

5.1.1 Schere zum Schneiden der Blätter.

5.1.2 Graduierte Glaspipette, für die Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) zu Methanol, Pipetten zum Dispensieren des Gemisches in Kulturröhrchen aus Glas (1 ml/Röhrchen) und Pasteurpipetten zur Rückgewinnung von Hexan nach der Extraktion der FAME.

5.1.3 Kulturröhrchen aus Glas (z. B. 1,3 cm $\times$ 10 cm) mit Schraubkappen aus Polytetrafluorethylen. Diese Kulturröhrchen wurden im Vorfeld mit fortlaufenden Nummern beschriftet, und zwar auf Klebeband (nicht direkt auf dem Glas, um die Gefahr eines Löschens zu vermeiden). Die Röhrchen wurden geprüft, um sicherzustellen, dass sie nicht angeschlagen oder anderweitig beschädigt sind (um ihre Dichtheit zu gewährleisten).

5.1.4 System (z. B. Heizblock) zum Erwärmen der Röhrchen auf 80 °C.

5.1.5 Tischzentrifuge, zum Zentrifugieren der Röhrchen bei 200 g bis 300 g und Trennen der wässrigen Phase vom Hexan.

5.1.6 Gaschromatographie-Fläschchen mit Einsätzen und Schraubkappen mit Polytetrafluorethylen-Septum.

5.1.7 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) und Kapillarsäule zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Methylestern von Fettsäuren mit 12 Kohlenstoffatomen bis 22 Kohlenstoffatomen, bei allen möglichen Längen der aliphatischen Kette, um die gesättigten Ester, die einfach ungesättigten Ester, die zweifach ungesättigten Ester und die dreifach ungesättigten Ester jeweils voneinander zu trennen.

ANMERKUNG 1 Die Untersuchungen, die zur Erstellung dieses Dokuments führten, wurden meist unter Verwendung eines Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 Serie II oder Hewlett Packard 7890A) mittels einer Carbowax-Kapillarsäule mit einer Länge von 15 m, einem Durchmesser von 0,53 mm und einer Filmdicke von 1,2 μm (Altech,

Deerfield, IL., USA) oder einer DB-WAX-Kapillarsäule mit einer Länge von 15 m, einem Durchmesser von 0,53 mm und einer Filmdicke von 1 µm (Agilent, Santa Clara, CA., USA) mit Helium als Trägergas durchgeführt.¹

5.2 Reagenzien

5.2.1 Methanol (99 %) und Schwefelsäure (H₂SO₄), Bestandteile der Umesterungslösung.

5.2.2 Destilliertes Wasser und Hexan (99 %) zum Extrahieren der FAME.

6 Probenahmestrategien

Da die Fettsäurezusammensetzung bei Pflanzen in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen variieren kann, sollten in den verglichenen Gebieten die gleichen klimatischen Bedingungen (Feuchtigkeit, Temperatur, Sonnenlicht) herrschen. Außerdem gilt: Da der Omega-3-Index ein Frühindikator ist, hat seine Messung keine Relevanz, wenn bei Pflanzen, die auf einer bestimmten Fläche gewachsen sind, ein auffälliger Phänotyp (stark reduzierte Biomasse, starke Blattchlorose usw.) festgestellt wird, bei Pflanzen auf einer anderen Fläche jedoch nicht.

Je nach Ziel der Untersuchung können von jeder interessierenden Fläche eine oder mehrere Angiospermenarten als Proben entnommen werden. Bei den meisten Untersuchungen empfiehlt es sich, mehrere Arten (wenn möglich drei bis acht) zur Beurteilung eines bestimmten Standorts (beispielsweise Boden einer Deponie für Metallabfälle) heranzuziehen. Bei einer Beschränkung auf nur eine Art ist es möglich, dass zufälligerweise Proben einer hochresistenten (oder einer empfindlichen) Art genommen werden. Je größer die Anzahl der untersuchten Arten, desto besser repräsentieren die Ergebnisse die „Bodenbeschaffenheit“ für die gesamte Phytozönose. Deshalb werden in diesem Fall zunächst die verschiedenen Flächen des Standorts erkundet, und die zu untersuchenden Arten werden, soweit möglich, unter den repräsentativsten Beispielen ausgewählt, die auf allen Flächen vorkommen. Es sollte jeweils ein Blatt (oder ein Stück eines Blattes, wenn ganze Blätter zu groß sind, um vollständig in 1 ml Methanol/H₂SO₄ eingetaucht zu werden, siehe 8.2) von vier bis acht Individuen je Art von jeder Fläche als Probe genommen werden. Einige Pflanzenarten, die bereits erfolgreich zur Beurteilung der Böden von (durch organische Verbindungen und/oder Metalle) kontaminierten Standorten verwendet wurden, sind in Anhang C angegeben.

Auch wenn es nicht möglich ist, auf allen Flächen Proben von derselben Art zu nehmen, bleibt es trotzdem möglich, den Omega-3-Index zu bestimmen. Jedoch sollten in diesem Fall (i) alle Arten, von denen auf einer gegebenen Fläche Proben genommen werden, auf mindestens einer anderen Fläche vorkommen und beprobt werden und (ii) alle Flächenpaare mindestens eine Art, von der Proben genommen werden, gemeinsam haben.

Zu beachten ist, dass bei einer Beurteilung landwirtschaftlicher Verfahren die einzige zu beprobende Pflanzenart in der Regel die einzige von Interesse ist, nämlich die Kulturpflanzenart. Wenn nur von einer Art Proben genommen werden, wird das Blatt (oder ein Stück Blatt) von 6 Individuen bis 12 Individuen je Fläche entnommen.

¹ Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO.

7 Probenahme von Blattgewebe

Die folgenden Empfehlungen sollten befolgt werden, damit die als Probe entnommenen Blattgewebe für eine nachfolgende Analyse geeignet sind:

- Da bei der Umesterungsreaktion Fettsäure-Methylester aus biologischen Proben gewonnen werden und die Gegenwart von Wasser die Hydrolyse der gebildeten Ester zur Folge hat, **muss ein Vorhandensein von Fremdwasser auf den biologischen Proben vermieden werden**. Wenn die Blätter nass sind, ist es also erforderlich, vor einer Probenahme das Wasser auf ihrer Oberfläche mit einem saugfähigen Papier zu entfernen;
- Blätter, die unter hydrischem Stress (Trockenheit) oder biotischem Stress (Krankheitserreger) stehen, werden nicht als Proben genommen. Es sollten nur grüne Blätter entnommen werden;
- die Blätter werden an Pflanzen ähnlicher Größe entnommen. Dementsprechend sollten für die Messung des Omega-3-Index nicht auf einer Fläche Blätter von niedrigen Pflanzen und auf einer anderen Blätter von hohen Pflanzen entnommen werden (siehe Anhang D und [12]);
- vorsorglich wird empfohlen, nur voll entwickelte Blätter zu entnehmen und von in Entwicklung befindlichen abzusehen (siehe Anhang D);
- wenn bei einer bestimmten Art nur ein Teil des Blattes als Probe entnommen wird, wird bei allen Individuen der gleiche Teil (beispielsweise der distale Teil) des Blattes entnommen;
- vorsorglich wird empfohlen, alle Pflanzen innerhalb von 2 h bis 3 h zu beproben (siehe Anhang D).

8 Gewinnung, Extraktion und Analyse von Fettsäure-Methylestern (FAME)

8.1 Prüfung auf Verunreinigungen

Um Verunreinigungen zu vermeiden, ist es notwendig, jeden Kontakt der Lösungen mit Kunststoff, Parafilm oder Klebstoff usw. zu vermeiden. Zur Sicherstellung, dass keine Verunreinigungen (z. B. durch Fehler bei der Durchführung des Verfahrens, durch kontaminierte Lösungen usw.) vorliegen, sollte vor jeder Analysenreihe eine Prüfung nach der gleichen Verfahrensvorschrift wie unter 8.2 und 8.3 angegeben, jedoch ohne biologische Gewebe in den Kulturröhrchen durchgeführt werden. Nach der GC-Analyse sollte das Gaschromatogramm mit Ausnahme des Hexan-Peaks keine Peaks aufweisen.

Jeden Kontakt der Lösungen mit Kunststoff vermeiden – diese Empfehlung gilt nicht für die Pipettenspitzen, die zum Aufnehmen der Lösung von Methanol/H₂SO₄ (40/1) oder Hexan verwendet werden.

8.2 Gewinnung und Extraktion von FAME aus Pflanzenblättern

Die Blattgewebe (ungefähr 1 cm × 1 cm) werden in die Kulturröhrchen (siehe 5.1.3) eingebracht, die 1 ml einer Lösung von Methanol/H₂SO₄ (40/1) enthalten. Die Röhrchen werden mit einer Schraubkappe verschlossen, die mit einer Polytetrafluorethylendichtung versehen ist. Die Röhrchen werden 1 h lang bei 80 °C erwärmt. Da Methanol bei einem Druck von 1 Atmosphäre bei 72 °C siedet, ist es zwingend erforderlich, jegliches Verdampfen zu vermeiden, sodass sich in den Röhrchen der Sättigungsdampfdruck einstellt. Deshalb ist es wichtig, dass sie dicht verschlossen sind. Außerdem ist es erforderlich, sich während der Dauer der Erwärmung durch Sichtprüfung (zunächst 20 min lang alle 5 min, danach alle 10 min) zu versichern, dass die Lösung von Methanol/H₂SO₄ nicht siedet. Wenn während der Erwärmung der Inhalt des Röhrchens siedet, wird das Röhrchen in Eis gesteckt, um es abzukühlen, anschließend wird die Kappe vollständig abgeschraubt und wieder festgeschraubt. Falls erforderlich, wird das Volumen durch Zugabe von Methanol wieder auf 1 ml eingestellt. Wenn der Inhalt danach immer noch siedet, wird der Inhalt des defekten Röhrchens in ein anderes Röhrchen mit einer anderen Kappe überführt. Die Fettsäurezusammen-