

DIN ISO 29200



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Beurteilung der genotoxischen Wirkungen auf höhere Pflanzen –
Mikrokern-Prüfung mit *Vicia faba* (ISO 29200:2013)**

Soil quality –
Assessment of genotoxic effects on higher plants –
Vicia faba micronucleus test (ISO 29200:2013)

Qualité du sol –
Évaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs –
Essai des micronoyaux sur *Vicia faba* (ISO 29200:2013)

Gesamtumfang 23 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

Seite

Nationales Vorwort	3
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Pflanzen, Prüfausrüstung und Reagenzien	7
5.1 Ausrüstung	7
5.2 Prüforganismen	7
5.3 Referenzsubstanz	7
5.4 Reagenzien	8
6 Materialien	8
6.1 Herstellung des zu untersuchenden Bodens	8
6.2 Vorbereitung der Samen	9
6.3 Versuchsdurchführung	10
6.4 Prüfumgebung	11
6.5 Vorbereitung der Zellen	11
7 Auswertung der Ergebnisse	13
7.1 Angaben der Daten	13
7.2 Statistische Analyse	13
7.3 Interpretation der Ergebnisse.....	13
8 Gültigkeitskriterien	13
9 Prüfbericht.....	13
Anhang A (informativ) Zusammensetzung des Hoagland-Mediums	15
Anhang B (informativ) Prüfung von den Böden zugesetzten Chemikalien.....	16
Anhang C (informativ) Ergebnisse des im Rahmen von NF T 90-327 durchgeführten Ringversuchs	17
Anhang D (informativ) Ergebnisse des mit der Referenzsubstanz und einem industriellen verunreinigten Boden durchgeführten Ringversuchs	19
Literaturhinweise	23

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (ISO 29200:2013) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird. Für Deutschland war der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN an der Bearbeitung beteiligt.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN [und/oder die DKE] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10381-6	siehe	DIN ISO 10381-6
ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN ISO 11260
ISO 11269-2	siehe	DIN EN ISO 11269-2
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465
ISO/TS 21268-1	siehe	DIN ISO/TS 21268-1 (DIN SPEC 1128)
ISO/TS 21268-2	siehe	DIN ISO/TS 21268-2 (DIN SPEC 1129)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 11269-2, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saataufgang und frühes Wachstum höherer Pflanzen*

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

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

DIN ISO/TS 21268-1 (DIN SPEC 1128), *Bodenbeschaffenheit — Eluierungsverfahren für die anschließende chemische und ökotoxikologische Untersuchung von Boden und von Bodenmaterialien — Teil 1: Schüttelverfahren mit einem Flüssigkeits-/Feststoffverhältnis von 2 l/kg Trockenmasse*

DIN ISO/TS 21268-2 (DIN SPEC 1129), *Bodenbeschaffenheit — Eluierungsverfahren für die anschließende chemische und ökotoxikologische Untersuchung von Boden und von Bodenmaterialien — Teil 2: Schüttelverfahren mit einem Flüssigkeits-/Feststoffverhältnis von 10 l/kg Trockenmasse*

Bodenbeschaffenheit — Beurteilung der genotoxischen Wirkungen auf höhere Pflanzen — Mikrokern-Prüfung mit *Vicia faba*

Einleitung

Im Rahmen der Beurteilung der Beschaffenheit von Böden und Bodenmaterialien erscheint es notwendig, ihr genotoxisches Potenzial, bedingt durch Verunreinigungen oder durch einen Dekontaminierungsvorgang, *in vivo* zu bestimmen. Genotoxische Wirkstoffe haben die Fähigkeit das Genom lebender Organismen zu schädigen oder ihre Lebensvorgänge zu beeinträchtigen, jedoch werden sie nicht immer durch chemische Analyse oder klassische ökotoxikologische Prüfungen erfasst. Genotoxische Wirkungen werden durchaus oft bei sublethalen Konzentrationen beobachtet, bei denen auf kurze Sicht keine toxische Wirkung (z. B. Überleben oder Wachstum) beobachtet werden kann, jedoch langfristige Wirkungen in lebenden Organismen zu befürchten sind. Darüber hinaus sind höhere Pflanzen wie *Vicia faba* (Ackerbohne) ökologisch von Bedeutung für die Beurteilung der Beschaffenheit von Böden und Bodenmaterialien.

1 Anwendungsbereich

Gegenstand dieser Internationalen Norm ist es, ein Verfahren zur Beurteilung der genotoxischen Wirkungen (Chromosomenbruch oder Dysfunktion der Mitosespindel) von Böden oder Bodenmaterialien auf die Seitenwurzeln von höheren Pflanzen: *Vicia faba* (Ackerbohne) zu beschreiben. Dieses Verfahren ermöglicht die Beurteilung der Genotoxizität (Toxizität für genetisches Material) von Boden und Bodenmaterial sowie Kompost, Schlamm, Abfall, Dünger. Zwei Wege der Exposition können in Betracht gezogen werden: Eine direkte Exposition der Pflanzen mit Boden (oder Bodenmaterial), welche wichtig ist für das echte genotoxische Potenzial und Exposition der Pflanzen mit dem Wasserextrakt des Bodens (oder Bodenmaterials). Der letztere Weg der Exposition der Pflanzen mit Sickerwasser oder Eluat erlaubt die Erfassung der Mutagene, die nicht an Böden adsorbieren und in die Bodenlösung gelangen. Darüber hinaus kann die Prüfung zur Abschätzung genotoxischer Wirkungen von chemischen Substanzen und Wässern, Abwasser usw. 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 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*

ISO 10390, *Soil quality — Determination of pH*

ISO 10694, *Soil quality — Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*

ISO 11260, *Soil quality — Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution*

ISO 11269-2:2012, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants*

ISO 11465, *Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method*

ISO/TS 21268-1, *Soil quality — Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials — Part 1: Batch test using a liquid to solid ratio of 2 l/kg dry matter*

ISO/TS 21268-2, *Soil quality — Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials — Part 2: Batch test using a liquid to solid ratio of 10 l/kg dry matter*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 Kontrollboden
nicht verunreinigtes Substrat, das als Kontrolle und als Verdünnungsmedium zur Herstellung der Verdünnungsreihen mit dem Prüfboden oder Prüfmaterial verwendet wird

BEISPIEL Kompost, Schlamm, Abfall, Chemikalien

3.2

Mitotischer Index

Anzahl der sich teilenden Zellen je 1 000 beobachteter Zellen, wenn alle Phasen der Mitose mitberücksichtigt werden, von der Prophase (wenn die Chromosomen zu kondensieren beginnen) bis zur Telophase (wenn das Chromatin der beiden Kerne an den Polen der Zelle geformt und die Dekondensation beendet ist)

3.3

Prüfmischung

Mischung des Prüfmateri als (Boden, Kompost, Schlamm, Abfall oder Chemikalie) mit dem Kontrollboden

4 Kurzbeschreibung

Diese genotoxische Prüfung basiert auf der Erfassung von Mikrokernen in den Zellen der Spitzen der Seitenwurzeln von *Vicia faba* (Ackerbohne). Die im Zytoplasma der Zellen sichtbaren Mikrokern e resultieren aus einem Chromosomenbruch (Wirkung der klastogenen Substanzen) oder einer Dysfunktion der Mitosespindel (Wirkung der Aneugen en).

In beiden Fällen können die Chromosomenfragmente oder die ganzen Chromosomen nicht in einen der Pole der Spindel während der Anaphase der Mitose migrieren und bilden deshalb einen (oder mehrere) Mikrokern(e).

Die Häufigkeit der Mikrokern e wird in den Zellen der Kontroll-Wurzeln und in denen, die dem Boden (oder Bodenmaterial) oder dem Wasserextrakt des zu prüfenden Bodens ausgesetzt wurden, bestimmt. Eine statistische Prüfung ermöglicht dann die Bestimmung der Signifikanz der Daten.

5 Pflanzen, Prüfausrüstung und Reagenzien

5.1 Ausrüstung

Die Exposition der Pflanzen mit den Böden und Bodenmaterialien während der Prüfung erfolgt in Plastikgefäßen (Durchmesser: 9 cm, Höhe: 10 cm).

Exposition mit dem Wasserextrakt der Böden erfolgt in Glasgefäßen (z. B. Glaskolben mit einem Volumen von 200 ml).

Ein Mikroskop, ausgestattet mit einem Objektiv mit 400-facher Vergrößerung, ist zur Untersuchung der mikroskopischen Wirkungen der Zellen erforderlich.

5.2 Prüforganismen

Als Pflanze wurde *Vicia faba* (Ackerbohne) cv. Aguadulce, mit einer sehr langen Hülse, aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber Mikroverunreinigungen und der einfachen Beschaffung ausgewählt. Diese höhere Pflanze ist Teil der Familie der Hülsenfrüchtler und der Klasse der Dicotyledoneae.

Mit Insektiziden und/oder Fungiziden behandeltes Saatgut sollte nicht verwendet werden.

5.3 Referenzsubstanz

Maleinsäurehydrazid wird als Referenzsubstanz empfohlen. Die Positivkontrolle wird bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l durchgeführt, bzw. 1,12 mg/kg und 1,12 mg/l für Festphasen- und Flüssigphasen-Exposition.

Die Herstellung der sich durch Licht zersetzenden Substanz sowie die Exposition der Pflanze mit der Lösung sind im Dunkeln durchzuführen.