

DIN EN ISO 18187



ICS 13.080.30

Entwurf

Einsprüche bis 2023-08-31
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 18187:2018-07

**Bodenbeschaffenheit –
Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von
Arthrobacter globiformis (ISO/DIS 18187:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18187:2023**

Soil quality –

Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2023);

German and English version prEN ISO 18187:2023

Qualité du sol –

Essai contact pour échantillons solides utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2023);

Version allemande et anglaise prEN ISO 18187:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-06-30 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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 naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, 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 72 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18187:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN(Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten 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 10390	siehe	DIN EN ISO 10390
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11268-2	siehe	DIN EN ISO 11268-2
ISO 15799	siehe	DIN EN ISO 15799

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 18187:2018-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Literaturhinweise aktualisiert;
- b) Norm redaktionell überarbeitet.

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 10390, *Boden, behandelter Bioabfall und Schlamm — Bestimmung des pH-Werts*

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 und andere Regenwurmart*

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

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*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 18187:2023-08

– Leerseite –

**Bodenbeschaffenheit – Feststoffkontakttest unter Verwendung der
Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2023)**

Soil quality – Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2023)

Qualité du sol – Essai contact pour échantillons solides utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	10
5 Reagenzien und Material	10
5.1 Prüforganismen	10
5.2 Kontrollsubstrate	11
5.2.1 Allgemeines	11
5.2.2 Kontrolle für Böden	11
5.2.3 Kontrolle für Abfälle	12
5.3 Prüfsubstrate	12
5.4 Chemikalien	12
6 Geräte	15
7 Durchführung	16
7.1 Herstellung von Verdünnungen	16
7.2 Referenzsubstanz und Herstellung der Positivkontrolle	16
7.3 Durchführung des Kontakttests	16
7.3.1 Allgemeines	16
7.3.2 Belüftung	17
7.3.3 Deaktivierung	17
7.3.4 Herstellung des Inokulums	18
7.3.5 Bebrütung und Messung der Fluoreszenz	18
7.4 Störungen	18
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	19
8.1 Berechnung	19
8.1.1 Relative Fluoreszenz	19
8.1.2 Bestimmung des Prozentsatzes der Hemmung	19
8.2 Angabe der Ergebnisse	19
9 Gültigkeit der Prüfung	20
10 Statistische Analyse	21
11 Prüfbericht	21
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	23
A.1 Ziel	23
A.2 Hintergrund	23
A.3 Prüfgut und -verfahren	23
A.4 Datenanalyse	24
A.5 Auswertung der vorläufigen Ergebnisse	25
Anhang B (informativ) Vorbereitung der Prüforganismen	30
B.1 Allgemeines	30
B.2 Anlegen der Stammkultur	30
B.3 Gefriertrocknen von Bakterien	30
B.4 Qualitätskontrolle	31
Anhang C (informativ) Prüfung von chemischen Substanzen	32
C.1 Allgemeines	32
C.2 Kontroll- und Prüfsubstrat	32
C.3 Untersuchung von Chemikalien	32
Literaturhinweise	34

Bilder

Bild 1 — Beispiel einer Messung der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit im Kontrollboden LUFA-Standardboden Typ 2.2 und Kontrollboden LUFA-Standardboden Typ 2.2, aufgestockt mit C16-BAC	20
---	-----------

Tabellen

Tabelle 1 — Überblick über die Prüfdurchführung	17
Tabelle A.1 — Im jeweiligen System geprüfte Substrate und Chemikalien	24
Tabelle A.2 — Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs an Abfall und Bodenproben sowie chemischen Verbindungen — Gültigkeit, Annahme und Empfindlichkeit (MDD) des Versuchs	25
Tabelle A.3 — Variabilität innerhalb eines Laboratoriums (CVr), berechnet für die Anstiegswerte, die für drei Kontrollsubstrate in neun Laboratorien (L1 bis L9) erhalten wurden	26
Tabelle A.4 — Variabilität, berechnet für den Prozentsatz der Hemmung der Dehydrogenaseaktivität unter Einwirkung der Referenzsubstanz C16-BAC in neun Laboratorien (L1 bis L9)	27
Tabelle A.5 — Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs an Abfall und Bodenproben sowie chemischen Verbindungen — Bewertung der Variabilität des Versuchs auf der Grundlage der Punktschätzwerte von ECx	28

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18187:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 18187:2018 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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/DIS 18187:2023 wurde von CEN als prEN ISO 18187:2023 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).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung von ISO-spezifischen Begriffen und Ausdrücken im Zusammenhang mit der Konformitätsbewertung sowie Informationen über die Einhaltung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) im Bereich der technischen Handelshemmnisse (TBT) durch ISO finden Sie unter www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Subcommittee SC 4, Biological methods erstellt.

Diese zweite/dritte/... Ausgabe annulliert und ersetzt die erste/zweite/... Ausgabe (ISO #####:#####), die technisch überarbeitet wurde.

Die wichtigsten Änderungen sind wie folgt:

— xxx xxxxxxxx xxx xxxxx

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

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 [15] [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 [10] [12] [14] [15] [19].

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 und in den Literaturhinweisen [33] 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. Obwohl dies nicht der Hauptzweck ist, kann der Kontakttest auch zur Prüfung der Wirkung von Chemikalien verwendet werden, wie in Anhang C beschrieben. 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 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 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.

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 <https://www.electropedia.org/>

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* 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 beteiligt sind an vielen Energie-, Redoxreaktionen und biosynthetische Stoffwechselprozesse (z. B. die Atmungskette), die zur Herstellung der Zellintegrität erforderlich sind

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 ECx wird als ein Prozentwert des geprüften Bodens oder Abfalls je Trockenmasse Bodenmischung angegeben. Wenn Chemikalien geprüft werden, wird die ECx 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 kinetischen 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.

4 Kurzbeschreibung

Das Bakterium *Arthrobacter globiformis* wird zum Feststoff hinzugefügt und 2 h bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Nach dieser Kontaktzeit wird der nicht toxische Redox-Farbstoff Resazurin hinzugefügt. Aufgrund der Dehydrogenaseaktivität wird Resazurin in extrazellulärer Umgebung in Resorufin umgewandelt [6]. Resorufin kann in Gegenwart des Feststoffes fluorometrisch nachgewiesen werden (Anregung bei 535 nm, Emission bei 590 nm). Die Zunahme von Resorufin wird durch Messung der Fluoreszenz im Zeitraum von 1 h im Abstand von 15 min bestimmt. Um die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität zu bestimmen, wird die Geschwindigkeit der Zunahme von Resorufin in der Probe mit der Geschwindigkeit der Resorufinzunahme in der Kontrolle verglichen. Bei Vorhandensein toxischer Substanzen wird eine Hemmung der Dehydrogenaseaktivität erwartet. Das spiegelt sich in der Abnahme der Resorufinbildung und der anschließenden Verringerung der Fluoreszenzemission wieder.

5 Reagenzien und Material

5.1 Prüforganismen

Der Prüforganismus ist *Arthrobacter globiformis* (Conn 1982) Conn und Dimmick 1947 (Stammnummer ATCC 8010™ *Arthrobacter globiformis* (Conn) Conn and Dimmick), der in Böden verbreitet ist. *Arthrobacter*-Arten gehören zur Familie der *Micrococcaceae*. Das sind hauptsächlich obligat aerobe Organismen, auch wenn einige Arten bei einschränkenden Sauerstoffverhältnissen einen anaeroben Stoffwechsel aufweisen können [9]. *Arthrobacter* spp. sind chemoheterotroph und weisen pleomorphe Eigenschaften auf, da sie beim Eintreten in die stationäre Phase eine Änderung der Morphologie von stäbchenförmig zu kokkoid zeigen. Obwohl *Arthrobacter* grampositiv ist, kann es sich während der log-Phase gramnegativ färben. Schwankungen der Zellwanddicke während des Bakterienwachstums können durch unterschiedliche Färbung der Granula zur Gram-Variabilität führen [22]. Diese Eigenschaft bedingt jedoch keine unterschiedliche Empfindlichkeit der Versuche, sofern während der Reaktionszeit ein Inokulum in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet wird. *Arthrobacter globiformis* ist der Risikogruppe I — nicht pathogener Organismus — zugeordnet.

Der Bakterienstamm kann aus handelsüblichen gefriergetrockneten oder flüssiggetrockneten Reagenzien erhalten oder von Kultursammlungen, z. B. Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Stammnummer 20124), oder ARS Culture collection NCAUR¹⁾, bezogen werden. Die für Toxizitätsmessungen

1) Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Braunschweig, Deutschland, oder ARS (Agricultural Research Service) Culture collection (auch als NRRL bekannt), das zum National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), 1815 N, University Street, Peoria, Illinois 61604, USA gehört, sind Beispiele von Firmen, die diese Bakterien verkaufen. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Firmen durch ISO.

verwendeten Bakteriensuspensionen müssen frisch aus Stammkulturen hergestellt werden oder direkt aus einer gebrauchsfertigen gefriergetrockneten Charge verwendet werden. Das Anlegen der Stammkultur und der Prozess der Gefrier Trocknung der Bakterien sind in Anhang B beschrieben.

5.2 Kontrollsubstrate

5.2.1 Allgemeines

Die aus den nachstehend angeführten Möglichkeiten gewählten Kontrollsubstrate dienen zur Herstellung sowohl der Negativkontrollen (Zugabe von destilliertem Wasser, siehe 5.2.2, 5.2.3) als auch der Positivkontrollen (Zugabe der Referenzsubstanz, siehe 7.2). Das Befeuchten des Kontrollsubstrates (Boden oder Abfall) muss einen Tag oder zwei Tage vor Prüfbeginn erfolgen (siehe Tabelle 1). Das Substrat ist/die Substrate sind bis zum Beginn der Prüfung bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ zu lagern.

5.2.2 Kontrolle für Böden

Es gibt drei Möglichkeiten bezüglich der Wahl des Kontrollbodens (siehe auch Literaturhinweis [4]). Der Referenzboden a) wird bevorzugt, wenn jedoch ein derartiger Boden nicht zur Verfügung steht, darf entweder ein natürlicher oder ein künstlicher Standardboden verwendet werden. In jedem Fall sollte der Wassergehalt des Kontrollbodens auf 20 % eingestellt werden.

- a) Sind Referenzböden von nicht verunreinigten Flächen in der Nähe eines verunreinigten Standortes verfügbar, sollten sie wie die zu prüfenden Böden behandelt und charakterisiert werden. Wenn eine toxische Verunreinigung oder ungewöhnliche Bodeneigenschaften nicht ausgeschlossen werden können, sollten Standardkontrollböden nach b) oder c) bevorzugt werden.
- b) natürlicher Standardboden mit den folgenden Eigenschaften: $C_{\text{org}} \leq (1,7 \text{ bis } 2,6) \%$; Gehalt an Sand (Korngröße 0,063 mm bis 2 mm) 50 % bis 75 %; < 20 % der Körner kleiner als 0,02 mm, pH-Wert 5 bis 7,5.

BEISPIEL LUFA-Standardboden Typ 2.2.²⁾

- c) künstlicher Standardboden oder Quarzsand (mit 50 % bis 75 % Sand mit einer Partikelgröße zwischen 0,063 mm und 2 mm; pH 5,5 bis pH 6,5).

Das als künstlicher Boden [17] bezeichnete Substrat hat die folgende Zusammensetzung:

	Massenanteil in % bezogen auf Trockenmasse
— Fein gemahlener Sphagnum-Torf ohne sichtbare Pflanzenreste (Korngröße $\leq 1 \text{ mm}$)	5 %
— Kaolin, mit mindestens 30 % Kaolinit	20 %
— Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu 50 % bis 75 % eine Korngröße von 0,063 mm bis 2 mm aufweist)	74 %
— Kalziumkarbonat	1 %

Mit modifizierter Korngröße von Torf und Quarzsand hergestellter künstlicher Boden sollte genauer analysiert werden. Sind in diesem künstlichen Substrat Partikel geringer Dichte vorhanden (z. B. Torf), die aufitreiben können, kann dies die Fluoreszenzmessung beeinflussen, aber es können auch andere Kontrollböden (wie oben vorgeschlagen) ausgewählt werden.

2) LUFA-Standardboden Typ 2.2 ist die Herstellerbezeichnung des Produkts, geliefert von LUFA Speyer. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.2.3 Kontrolle für Abfälle

Quarzsand [siehe 5.2.2, c)]. Der Quarzsand sollte einen Wassergehalt von 20 % aufweisen.

5.3 Prüfsubstrate

Die Proben (Boden oder Abfall) sollten möglichst bald nach der Probenahme untersucht werden. Die Proben sind entsprechend den folgenden Festlegungen zu entnehmen:

- nach ISO 18400-206 für Böden, oder
- nach ISO 5667-15, EN 14735 und CEN/TR 15310-1 für Abfälle.

Die Proben sind höchstens zwei Wochen im Dunkeln bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu lagern. Für eine Langzeitlagerung dürfen die Proben bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ eingefroren werden.

Boden- und Abfallproben sind durch ein Sieb mit quadratischen Maschen von 2 mm Seitenlänge zu sieben. Abfallrohstoffe (z. B. Baustellenabfälle) sollten vor der Prüfung gemahlen werden (nach EN 14735). Das Screening von Metallen und organischen Verunreinigungen in den Proben wird dringend angeraten, da es hilfreiche Informationen für die Datenauswertung liefert.

Für die Auswertung der Prüfergebnisse sollten die folgenden Eigenschaften für jede Probe bestimmt werden:

- a) pH-Wert nach ISO 10390 für Bodenproben, EN 15933 für Bioabfallproben und ISO 10390 für andere feste Abfälle;
- b) Gefüge (Sand, Lehm, Schluff) nach ISO 11277;
- c) Wassergehalt nach ISO 11465 für Bodenproben und EN 15934 für Bioabfallproben;
- d) Wasserhaltekapazität nach ISO 11268-2;
- e) Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260;
- f) organischer Kohlenstoff nach ISO 10694 für Bodenproben und EN 15936 für Bioabfallproben.

Mit diesem Kontakttest werden nur Proben mit pH-Werten zwischen 5 und 9 in geeigneter Weise bewertet (siehe 7.4). Der Wassergehalt ist auf 20 % (Boden, Abfall; siehe 5.2.2 und 5.2.3) einzustellen. Diese Einstellung ist nach dem ursprünglichen Wassergehalt der Proben zu berechnen, der vor der Vorbereitung der Prüfung bestimmt werden sollte. Das Befeuchten der Proben muss einen Tag oder zwei Tage vor Prüfbeginn erfolgen (siehe Tabelle 1). Die Proben sind bis zum Beginn der Prüfung bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu lagern.

Bei der Verwendung von natürlichen Proben dürfen auch Verdünnungen hergestellt werden (siehe 7.1).

Bei der Prüfung einer chemischen Substanz im Boden sollte eine andere Verfahrensweise eingehalten werden (siehe Anhang C).

Abfall, der aus Klärschlamm mit einem hohen Anteil an organischer Substanz (en: organic matter, OM) oder gesamtem organischen Kohlenstoff (en: total organic carbon, TOC) bestehen, sollten mit mehr Wasser angereichert werden (z. B. Wassergehalt eingestellt auf 33 %). Um den geeigneten Prozentsatz an Wasser entsprechend dem Gehalt an OM oder TOC in Proben dieser Art zu definieren, werden weitere Prüfungen entwickelt.

5.4 Chemikalien

Sofern nicht anders festgelegt, dürfen nur analysenreine Reagenzien verwendet werden.

5.4.1 Wasser, sterilisiert und nicht sterilisiert, vollentsalzt, destilliert oder von gleichwertiger Reinheit (Leitfähigkeit $< 10 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5.4.2 Dimethylsulfoxid-Lösung (DMSO), $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, Volumenanteil von 4 % in destilliertem Wasser.

Die Lösung ist durch Filtration durch ein Membranfilter aus Polyamid mit einer Porenweite von $0,2 \mu\text{m}$ unter Anwendung einer Spritze zu sterilisieren.

5.4.3 Natriumhydroxid-Lösung, NaOH , z. B. mit einer Konzentration von $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

ANMERKUNG Zur Einstellung des mittleren pH-Wertes kann es notwendig sein, Basen mit geringerer oder höherer Konzentration zu verwenden.

5.4.4 Salzsäure, HCl , z. B. mit einer Konzentration von $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

ANMERKUNG Zur Einstellung des mittleren pH-Wertes kann es notwendig sein, Säuren mit geringerer oder höherer Konzentration zu verwenden.

5.4.5 Nährmedium A, für die Stammkultur von *A. globiformis* (pH-Wert 7,2 bis 7,4).

Zu lösen sind:

- 10 g Pepton aus Casein,
- 5 g Hefeextrakt,
- 5 g D(+)-Glucose und
- 5 g NaCl

in Wasser (5.4.1), alles ist mit Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen und 20 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu autoklavieren. Wenn die Lösung im sterilen Zustand (ungeöffnet) bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu 12 Monate stabil.

5.4.6 Nährmedium B, zur Herstellung des Lyophilisats und der Prüflösung.

333,3 ml Nährmedium A (5.4.5) sind in 666,6 ml sterilisiertem Wasser zu verdünnen. Oder zu lösen sind:

- 3,33 g Pepton aus Casein,
- 1,67 g Hefeextrakt,
- 1,67 g D(+)-Glucose und
- 1,67 g NaCl

in Wasser (5.4.1) und das Volumen ist mit Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen. Das Medium ist 20 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu autoklavieren. Wenn die Lösung im sterilen Zustand (ungeöffnet) bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu 12 Monate stabil.

5.4.7 Schrägagar (Casein-Sojamehl-Pepton), für eine dichte Zellsuspension von *A. globiformis*.

40 g Trypton-Soja-Agar sind in Wasser (5.4.1) zu lösen und alles ist mit Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen. Nach dem Lösen sind 7 ml dieses Mediums in Kulturröhrchen zu verteilen (6.15). Die Röhrchen sollten so gefüllt werden, dass der Agar bis genau 50 mm unterhalb des Halses fließen kann, wenn der Hals auf eine waagrecht angeordnete 10-ml-Glaspipette gelegt wird. Die Röhrchen sind mit Deckeln zu verschließen und 20 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu autoklavieren. Nach dem Abkühlen sind die Röhrchen gebrauchsfertig.

5.4.8 Schutzmedium, zum Gefriertrocknen der Bakterien.

Zu lösen sind:

- 20 g Magermilchpulver und
- 5 g *myo*-Inositol

in Wasser (5.4.1), alles ist mit Wasser auf 100 ml aufzufüllen und 10 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu autoklavieren. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ ist das Medium unverzüglich in einem Eisbad anzuordnen, um ein Karamellisieren zu verhindern. Wenn die Lösung im sterilen Zustand (ungeöffnet) bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu 12 Monate stabil.

5.4.9 Phosphatpuffer.

Zu lösen sind:

- 8,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- 13,24 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- 2 g Natriumacetat, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ und
- 2 g D(+)-Glucose

in Wasser (5.4.1) und alles ist mit Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen. Der pH-Wert der Pufferlösung ist mit verdünnter Salzsäure (5.4.4) oder Natriumhydroxid-Lösung (5.4.3) auf $7,0 \pm 0,2$ einzustellen. Das Medium ist 20 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu autoklavieren. Wenn die Lösung bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu 12 Monate stabil.

5.4.10 Resazurin-Farbstofflösung.

(45 ± 1) mg Resazurin sind in 1 000 ml Phosphatpuffer (5.4.9) zu lösen. Wenn die blau gefärbte Lösung bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu einer Woche stabil.

5.4.11 Benzyltrimethylhexadecylammoniumchlorid, Referenzsubstanz [auch bezeichnet als Cetalkoniumchlorid (C16-BAC)], $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (CAS-Nr.: 122-18-9).

Das ist ein quaternäres Ammoniumsalz, das häufig als antimikrobielles Agens eingesetzt wird. C16-BAC ist ein Homolog von BAC (Benzalkoniumchlorid, ein C12-Homolog), das ein Gemisch aus Alkylbenzyltrimethylammoniumchloriden darstellt, das hauptsächlich aus Cetalkoniumchlorid besteht. C16-BAC ist in Wasser mäßig löslich (zwischen $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und $85 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) und die Lösung kann, wann immer das nötig ist, zum Homogenisieren mit Ultraschall behandelt werden. Wenn die Lösung bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln gelagert wird, ist sie bis zu einer Woche stabil. Der Wirkungsmechanismus ist hauptsächlich auf gramnegative Bakterien ausgerichtet, indem die Durchlässigkeit der Zytoplasmamembran beeinflusst wird, was zur Zytolyse führt [20].

5.4.12 Kupfersulfat(II)-pentahydrat, zusätzliche Referenzsubstanz (CAS-Nr.: 7758-99-8).

Eine Stammlösung in Wasser (5.4.1) ist herzustellen, bevor der Quarzsand mit dem entsprechenden Volumen versetzt wird, um eine endgültige Konzentration von $500 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ Trockenmasse im Boden zu erreichen.

5.4.13 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), zusätzliche Referenzsubstanz (CAS-Nr.: 591-35-5).

Eine Stammlösung in Wasser (5.4.1) ist herzustellen, bevor der Quarzsand mit dem entsprechenden Volumen versetzt wird, um eine endgültige Konzentration von $100 \text{ mg 3,5-DCP kg}^{-1}$ Trockenmasse im Boden zu erreichen.

5.4.14 Zinksulfat-Heptahydrat, zusätzliche Referenzsubstanz (CAS-Nr.: 7446-20-0).

Eine Stammlösung in Wasser (5.4.1) ist herzustellen, bevor der Quarzsand mit dem entsprechenden Volumen versetzt wird, um eine endgültige Konzentration von $100 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ Trockenmasse im Boden zu erreichen.

6 Geräte

Anzuwenden sind die übliche Laborausrüstung und Folgendes.

6.1 Autoklav.

6.2 Ultraschallbad.

6.3 Sterilbank.

6.4 Gefrierschrank, -20°C und -80°C zur Lagerung der Lyophilisate und der Stammkulturen.

6.5 Erlenmeyerkolben, mit Zellulosestopfen, als Kulturgefäß, mit einem Nennvolumen von 100 ml (z. B. Literaturhinweis [1]).

6.6 Temperaturregelter Brutschrank, der auf einer Temperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gehalten werden kann.

6.7 Horizontalschüttelmaschine.

6.8 Photometer, geeignet zum Messen der optischen Dichte bei 600 nm.

6.9 Fluorimeter für Mikrotiterplatten, Emission bei 590 nm, Anregung bei 535 nm.

ANMERKUNG Beispielsweise kann ein Fluorimeter die folgenden Merkmale aufweisen: Empfindlichkeit um 5 pM Fluorescein (höchster und niedrigster Anzeigewert), dynamischer Bereich von 5 Dekaden, filterabhängiger Bandpass, Tungsten-Quartzhalogenlampe mit einem Photomultiplier (PMT)-Detektionssystem.

6.10 pH-Messgerät.

6.11 Multipette oder Mikropipetten, 10 000 µl, 1 000 µl, 200 µl und 20 µl.

6.12 Spitzen oder Combitips, (geeignet für 10 ml), autoklavierbar.

6.13 Mikrotiterplatten, 24 Vertiefungen, mit Abdeckung, transparent und Flachboden.

6.14 Rundkolben (Glasflasche mit Rundboden) und anpassbares Aufsatzfilter, mit einer Porenweite von $0,22 \mu\text{m}$, sofern für die Gefriertrocknungsanlage notwendig.

6.15 Kulturröhrchen aus Glas mit Deckeln, $16 \text{ mm} \times 160 \text{ mm}$, für Schrägagar.

6.16 Gefäße mit Schraubverschluss, beständig bis -80°C , mit einem Nennvolumen von 1,5 ml oder 2 ml.

6.17 Membranfilter aus Polyamid, Porenweite $0,2 \mu\text{m}$, Durchmesser 25 mm, und Spritze.

6.18 Wasserbad.

6.19 Gefriertrocknungsanlage (Lyophile).

6.20 Sieb, Porenweite 2 mm.

7 Durchführung

7.1 Herstellung von Verdünnungen

Wenn sehr toxische Proben zu untersuchen sind, darf eine geometrische Verdünnungsreihe durch Mischen verschiedener Anteile der Probe (Boden oder Abfall, siehe 5.3) mit dem zugehörigen Kontrollsubstrat (siehe 5.2) hergestellt werden. Mischungsverhältnisse von 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 % und 0 % Trockenmasse Probe werden empfohlen. Zum Schluss ist der Wassergehalt, wie in 5.2 und 5.3 angegeben, anzupassen.

7.2 Referenzsubstanz und Herstellung der Positivkontrolle

Bei jedem Durchlauf eines Kontakttests sollte eine Positivkontrolle durchgeführt werden.

Als Referenzsubstanz für die Untersuchung von Bodenproben wird C16-BAC (siehe 5.4.11) empfohlen. In einem Ringversuch (siehe Literaturhinweis [15]) wurde der LUFA-Standardboden Typ 2.2 [siehe 5.2.2 b)] mit C16-BAC in einer Konzentration von $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ aufgestockt. Der Mittelwert der berechneten Hemmung betrug 58,2 % (BAC) [14]. Zur Herstellung der Positivkontrolle ist der LUFA-Standardboden Typ 2.2 [siehe 5.2.2 b)] mit C16-BAC (siehe 5.4.11) in einer Konzentration von $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Trockenmasse Boden) aufzustocken. Eine Stammlösung ist durch Lösen von $(600 \pm 2) \text{ mg}$ C16-BAC (siehe 5.4.11) in 100 ml destilliertem Wasser herzustellen. Anschließend sind 10 g LUFA-Standardboden Typ 2.2 mit 1 ml der Stammlösung ($6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) aufzustocken. Der Boden ist zu mischen, bis die Substanz homogen verteilt ist. Wenn das hergestellte Substrat für die Positivkontrolle bei -20°C gelagert wird, ist es bis zu sechs Monate stabil. Wenn ein frisch hergestelltes Substrat für die Positivkontrolle verwendet wird, sollte es ein oder zwei Tage vor Prüfbeginn hergestellt werden, um das Einstellen eines Gleichgewichts zwischen Boden und Chemikalie zu ermöglichen (siehe Tabelle 1). Der Wassergehalt des Substrats ist anzupassen (siehe 5.2).

Neben der Verwendung von LUFA-Standardboden Typ 2.2 sollte die Positivkontrolle auch für das Kontrollsubstrat hergestellt werden, das entsprechend der zu untersuchenden Probenart zu wählen ist (siehe 5.2). Daher können für die Prüfung von Abfallstoffen (oder Chemikalien, siehe Anhang C) andere Referenzsubstanzen verwendet werden, je nach den Ressourcen des Labors oder der Art der Verunreinigungen in der festen Probe (falls bekannt) oder den Prüfchemikalien. In diesen Fällen und in Übereinstimmung mit den Ringversuchsergebnissen (siehe Anhang A) wird empfohlen, Kupfersulfat(II)-pentahydrat (siehe 5.4.12; zu $500 \text{ mg Cu kg}^{-1}$), 3,5-DCP (siehe 5.4.13; zu $100 \text{ mg 3,5 DCP kg}^{-1}$) oder Zinksulfat-Heptahydrat (siehe 5.4.14; zu $100 \text{ mg Zn kg}^{-1}$) als zusätzliche Referenzsubstanzen zu verwenden, die mit Quarzsand versetzt werden. Dieser Kontrollboden wird ein oder zwei Tage vor Beginn des Tests aufgestockt (siehe Tabelle 1). Als Richtwert gilt, dass die erwähnten Konzentrationen eine mittlere Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von *A. globiformis* zwischen 40 % und 100 % für Kupfersulfat und zwischen 50 % und 80 % für 3,5-DCP und Zinksulfat bewirken.

7.3 Durchführung des Kontakttests

7.3.1 Allgemeines

Ein oder zwei Tage (Tag -2 oder Tag -1, siehe Tabelle 1) vor Prüfbeginn sind $(600 \pm 6) \text{ mg}$ der zuvor befeuchteten (negativen und positiven) Kontrollen (siehe 5.2) und des Prüfsubstrats (siehe 5.3) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen einzuwägen. Je Behandlung sind mindestens vier Wiederholungen zu verwenden. Von jedem Substrat (Kontroll- und Prüfsubstrate) ist die gleiche Menge einzuwägen, um jeweils zwei (vorzugsweise drei) Wiederholungen für die Blindproben A und B herzustellen (siehe 3.4, 3.5, Tabelle 1):

- Blindprobe A — Diese Blindprobe gibt die (als Fluoreszenz) gemessene verbleibende Dehydrogenaseaktivität bei den verschiedenen Behandlungen nach der Deaktivierung oder die Eigenfluoreszenz des Substratmaterials (z. B. Art der organischen Substanz) an. Die Fluoreszenz der Blindprobe A (Kontrollen und Untersuchungsproben) muss von der Fluoreszenz der entsprechenden Behandlungen, denen die Bakterien ausgesetzt sind, subtrahiert werden (siehe 8.1.1);
- Blindprobe B — Diese Blindprobe zeigt das Aktivitätsniveau der Dehydrogenase in natürlichen Proben und die Wirksamkeit des Deaktivierungsschrittes durch Vergleich mit Blindprobe A an. Folglich ist die Blindprobe B ein für die Datenauswertung nützlicher Messwert.

Die Untersuchung der Blindprobe B muss in getrennten Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Die Mikrotiterplatten sind bis zur weiteren Untersuchung mit einem Deckel verschlossen bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ im Dunkeln zu lagern.

Tabelle 1 — Überblick über die Prüfdurchführung

Prüftag	Schritt	Blindprobe B	Blindprobe A	Negativkontrolle	Positivkontrolle	Probe oder Testbehandlung
-2 oder -1	Herstellung von Verdünnungen	—	—	—	—	bei Bedarf
	Befeuchten des Substrates	x	x	x	x	x
	Aufstocken des Substrates	—	—	—	x	x (bei Prüfung von Chemikalien)
	Nicht verunreinigtes Material (Kontrolle) (mg Feuchtmasse)	600 ± 6	600 ± 6	600 ± 6	—	—
	Verunreinigtes oder aufgestocktes Substrat (mg Feuchtmasse)	600 ± 6	600 ± 6	—	600 ± 6	600 ± 6
		Lagerung der Mikrotiterplatten im Dunkeln bei 4 °C bis zum Prüfbeginn (Tag 0)				
-1	Belüften von Proben	—	—	—	—	wenn anaerob
0	Wasser (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
		—	Pasteurisierung/Deaktivierung von Blindprobe A und Prüfplatten ^a			
	Inokulum (ml)	—	—	0,4	0,4	0,4
	Nährmedium B (ml)	0,4	0,4	—	—	—
		Zwei Stunden Bebrütung im Dunkeln bei (30 ± 1) °C				
	Resazurin-Lösung (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
		Messung der Kinetik (alle 15 min) im Verlauf von 1 h				
^a Prüfplatten sind Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen, die Positiv- und Negativkontrollen sowie die Prüfproben enthalten, zu denen jeweils das <i>A. globiformis</i> -Inokulum gegeben wird. Zu den Platten mit den Blindproben A und B wird kein Inokulum zugegeben, sondern nur Nährmedium B. Bei den Platten mit der Blindprobe B wird keine Pasteurisierung/Deaktivierung vorgenommen.						

7.3.2 Belüftung

Falls anaerobe Böden und Abfälle vorliegen, sind diese einen Tag vor Beginn der Prüfung (Tag -1, siehe Tabelle 1) zu belüften, indem die Mischungen $[(600 \pm 6) \text{ mg Probe Feuchtmasse plus } 0,6 \text{ ml sterilisiertes destilliertes Wasser}]$ bis zu 24 h auf einer Horizontalschüttelmaschine bei einer geeigneten Schüttelfrequenz, z. B. 150 min^{-1} , geschüttelt werden, um das erste Gültigkeitskriterium (siehe Abschnitt 9) zu erfüllen. Wenn für die Bebrütung kein Wasser mehr hinzugefügt wird, darf nach dem Belüften kein Wasser entfernt werden (siehe 7.3.3).

7.3.3 Deaktivierung

Zu Prüfbeginn (Tag 0, siehe Tabelle 1) sind 0,6 ml sterilisiertes destilliertes Wasser in alle Wiederholungen zu geben und es ist mit dem Deaktivierungsschritt fortzufahren.

Die natürliche Dehydrogenaseaktivität der Substrate sollte durch die Vorbehandlung der Proben so weit wie möglich unterdrückt werden. Dies erfolgt durch Erwärmen (mit Ausnahme der Platten für die Blindprobe B) der verschlossenen Mikrotiterplatten mit den Prüfsubstraten und den (positiven und negativen) Kontrollsubstraten in einem Wasserbad bei $(85 \pm 2)^\circ\text{C}$ für 10 min. Anschließend sind sie für etwa 15 min in einem eisgekühlten Wasserbad auf Raumtemperatur abzukühlen. Dieses Erwärmungs-Abkühlungs-Verfahren sollte noch einmal wiederholt werden.

ANMERKUNG Dieser Schritt führt zusammen mit der Bebrütung bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (siehe 7.3.5) dazu, dass der Kontakttest nicht für die Untersuchung der Auswirkung von flüchtigen Verbindungen in natürlich verunreinigten oder aufgestockten Substraten geeignet ist, da diese bei Raumtemperatur $((21 \pm 3)^\circ\text{C})$ leicht verdunsten können. Außerdem kann das vorgeschlagene Erwärmen der Probe zum Abbau anderer Verunreinigungen führen. Eine zusätzliche Blindprobe (z. B. Blindprobe C), die nicht der Deaktivierung unterzogen und dem Prüforganismus ausgesetzt wird, kann zur Verbesserung der Datenauswertung einbezogen werden.

7.3.4 Herstellung des Inokulums

Das Inokulum kann a) aus einer Stammkultur oder b) aus einer Charge gefriergetrockneter Bakterien hergestellt werden.

- a) Die Herstellung des Inokulums muss einen Tag vor Prüfbeginn beginnen. Ein aliquoter Anteil von 1 ml der Bakterien-Stammkultur, hergestellt nach B.2, ist 16 h in 50 ml Nährmedium B (siehe 5.4.6) bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ und 150 min^{-1} zu kultivieren. Anschließend sind 1 ml in 50 ml frisches Nährmedium B zu überführen und 3 h bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ und 150 min^{-1} in einer Horizontalschüttelmaschine zu bebrüten. Die optische Dichte des hergestellten Inokulums in der log-Wachstumsphase ist auf $0,4 \pm 0,1$ einzustellen.
- b) Wenn gefriergetrocknete Bakterien (siehe B.3) verwendet werden, ist der Inhalt eines Gefäßes mit 0,5 ml sterilisiertem eisgekühltem Wasser (siehe 5.4.1) zu rekonstituieren und das Gefäß ist für etwa 20 min bis 30 min bei $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ stehen zu lassen. Die Suspension ist in 20 ml sterilisiertes Nährmedium B (siehe 5.4.6) zu überführen, das zuvor auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ erwärmt wurde, um ein Inokulum zu erhalten, das gebrauchsfertig für den Kontakttest ist. Die Herstellung des Inokulums durch Rekonstitution gefriergetrockneter Bakterien ist weniger zeitaufwändig.

7.3.5 Bebrütung und Messung der Fluoreszenz

In sämtliche Wiederholungen sind 0,4 ml Inokulum (siehe 7.3.4) zu geben, mit Ausnahme der Blindproben A und B, zu denen anstelle des Inokulums 0,4 ml Medium B hinzuzufügen sind. Die Platten sind im Dunkeln auf einer Horizontalschüttelmaschine bei einer Geschwindigkeit von 150 min^{-1} und einer Temperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 2 h zu bebrüten. Anschließend sind 0,8 ml Resazurin-Lösung (siehe 5.4.10) hinzuzufügen und unmittelbar im Anschluss daran ist die Fluoreszenz des gebildeten Produkts Resorufin direkt in der Mikrotiterplatte (Anregung bei $(535 \pm 20) \text{ nm}$, Emission bei $(590 \pm 20) \text{ nm}$) zu messen. Diese Messung ist im Verlauf einer Stunde alle 15 min zu wiederholen. In der Zwischenzeit sind die Platten erneut bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ auf der Horizontalschüttelmaschine zu bebrüten. Die Zunahme des Produkts Resorufin ist proportional zur Dehydrogenaseaktivität des Prüforganismus.

Der pH-Wert der Proben muss am Ende der Reaktionszeit mindestens in einer Wiederholung jeder Behandlung gemessen werden, um die Stabilität des pH-Wertes während der Kontaktreaktion zu bestätigen (siehe 7.4).

7.4 Störungen

Die Prüfung ist dann nicht anwendbar zur Beurteilung von Proben/Substraten mit pH-Werten (gemessen in CaCl_2) von weniger als 5 (z. B. saurer Waldboden) und mehr als 9.

Anaerobe Proben können zu einer Hemmung führen und müssen bis zu 24 h vor der Prüfung belüftet werden. Aerobe Proben brauchen nicht belüftet zu werden (siehe 7.3.2).

Die natürliche Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen in den Feststoffproben kann eine Dehydrogenaseaktivität aufweisen. Zur Inaktivierung dieser Mikroorganismen werden die Proben mindestens zweimal für