

DIN EN ISO 20130

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2020-01-22

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit
kolorimetrischen Substraten in Mikrotiterplatten (ISO 20130:2018);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20130:2019**

Soil quality –

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

German and English version prEN ISO 20130:2019

Qualité du sol –

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

Version allemande et anglaise prEN ISO 20130:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-11-22 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 75 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 prEN ISO 20130:2019 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) verantwortlich.

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 internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 18400-206	siehe	DIN ISO 18400-206

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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 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*

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe, Symbole und Abkürzungen	7
3.1 Begriffe	7
3.2 Symbole und Abkürzungen.....	7
4 Kurzbeschreibung.....	8
5 Reagenzien.....	8
5.1 Pufferlösungen und Reagenzien	8
5.2 Substrate und Standards.....	11
5.2.1 Herstellung von Standardlösungen.....	11
5.2.2 Herstellung von Substratlösungen.....	12
6 Geräte und Materialien.....	13
7 Durchführung.....	14
7.1 Erstellung von Kalibrierkurven.....	14
7.1.1 Allgemeines.....	14
7.1.2 PNP-Lösung	14
7.1.3 β -Naphthylamin-Lösung	14
7.1.4 Ammoniumchlorid-Lösung	15
7.2 Probenahme	16
7.2.1 Probenvorbereitung.....	16
7.2.2 Substratzugabe.....	17
7.2.3 Extinktionsmessungen	19
7.2.4 Messungen von Urease-Aktivitäten	19
8 Berechnung der Ergebnisse.....	19
9 Angabe der Ergebnisse	20
10 Gültigkeitskriterien.....	20
11 Methodenvalidierung Ringversuch.....	20
12 Prüfbericht.....	21
Anhang A (informativ) Validierung des Verfahrens und Ringversuche zur Bewertung von Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren.....	22
A.1 Zweck	22
A.2 Hintergrund.....	22
A.3 Prüfmaterialien und Methodologie.....	22
A.4 Datenanalyse.....	23
A.5 Validierungsparameter.....	26
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung von Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren.....	27

B.1	Zweck	27
B.2	Hintergrund.....	27
B.3	Prüfmaterialien und Methodologie	27
B.4	Auswertung der Ergebnisse der Kalibrierkurve	28
B.5	Auswertung der Ergebnisse der Bodenzymaktivitätsmessungen.....	32
	Literaturhinweise.....	39

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 prEN ISO 20130:2019 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 20130:2018 wurde von CEN als prEN ISO 20130:2019 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 Aktivitäten von Bodenenzymen eingesetzt werden, die aus toxischen Substanzen stammen oder von anderen anthropogenen Stoffen in kontaminierten Böden verglichen mit 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 kolorimetrische Substrate, welche für festgelegten 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 Mikroplatten-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 ± 2) °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 eingewägt 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 eingewägt und in Wasser gelöst. Die konzentrierte Lösung kann 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.

35,8 mg β -Naphthylamin werden in 50 ml Ethanol, 96%ig (0,071 %), gelöst. Diese 5 mmol/l Stammlösung muss bei -20 °C für ein Jahr aufbewahrt werden. Die Arbeitskonzentration beträgt 1 mmol/l (Verdünnung 1/5 in Wasser) und muss bei $(-20 \pm 2)\text{ °C}$ für ein Jahr aufbewahrt werden.

ANMERKUNG β -Naphthylamin hat eine akute Toxizität (oral, dermal, Inhalation), Kategorie 4, Sensibilisierung der Atemwege, Kategorie 1 und ist gefährlich für die aquatische Umwelt. Augenschilde¹, Vollpartikel-Atemschutzmaske Typ N100 (US)², geeignete Belüftung, spezielle Handschuhe³, Brille und Schutzschild müssen verwendet werden.

5.2.2 Herstellung von Substratlösungen

Handelsübliche kolorimetrische Substrate werden in Pulverform geliefert und sollten entsprechend den Spezifikationen in gefrorenem Zustand bei $(-20 \pm 2)\text{ °C}$, gekühlt bei $(4 \pm 2)\text{ °C}$ oder bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt werden. Sämtliche Substrate sollten im Voraus entsprechend den in Tabelle 3 aufgeführten Anforderungen hergestellt werden.

ANMERKUNG Das Volumen muss hinreichend sein, um eine zuverlässige Einwaage und Messung von Substraten zu ermöglichen. Es hängt außerdem von der Anzahl der benötigten Platten ab. Beispiele sind in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3 — Handelsübliche kolorimetrische Substrate für Messungen der Enzymaktivität und deren Ansatz zum Messen

Enzym	Substrat ^a (Lagerungstemperatur)	Mol- masse g/mol	Konzentration mol/l	Beispiele für Ansätze	Lagerung von Lösungen (Temperatur, Dauer)
Arylamidase	(S)-2-Amino-4-methyl-N-2-naphthylvaleramidmonohydrochlorid $(-20 \pm 2)\text{ °C}$ CAS-Nr.: 893-36-7	292,8	0,008	0,234 2 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	$(-20 \pm 2)\text{ °C}$ 1 Jahr
Arylsulfatase	Kalium-4-nitrophenylsulfat $(-20 \pm 2)\text{ °C}$ CAS-Nr.: 6217-68-1	257,26	0,025	0,322 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	$(-20 \pm 2)\text{ °C}$ 1 Jahr
β -Galactosidase	p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid $(-20 \pm 2)\text{ °C}$ CAS-Nr.: 3150-24-1	301,25	0,05	0,753 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	$(-20 \pm 2)\text{ °C}$ 1 Jahr
α -Glucosidase	4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid $(-20 \pm 2)\text{ °C}$ CAS-Nr.: 3767-28-0	301,25	0,025	0,375 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	$(-20 \pm 2)\text{ °C}$ 1 Jahr

1 <https://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=20009868>

2 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=Substance&term=msaadvantageseries1000fullfacerespirator1234598765+OR+msaultratwinfullfacerespirator1234598765&focus=product&mode=boolean>

3 <http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=9577418>

Enzym	Substrat ^a (Lagerungstemperatur)	Mol- masse g/mol	Konzen- tration mol/l	Beispiele für Ansätze	Lagerung von Lösungen (Temperatur, Dauer)
β -Glucosidase	4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (-20 ± 2) °C CAS-Nr.: 2492-87-7	301,25	0,05	0,753 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(-20 ± 2) °C 1 Jahr
N-Acetyl- Glucosaminidase	para-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D- glucosaminid (-20 ± 2) °C CAS-Nr.: 3459-18-5	342,31	0,01	0,171 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(-20 ± 2) °C 1 Jahr
Phosphatase saure Phosphatase und alkalische Phosphatase	4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz- Hexahydrat ($+4 \pm 2$) °C CAS-Nr.: 333338-18-4	371,12	0,05	0,928 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(-20 ± 2) °C 1 Jahr
Urease	Harnstoff > 98 % (RT) CAS-Nr.: 57-13-6	60,06	0,4	0,480 5 g sind in 20 ml deionisiertem Wasser zu lösen	+4 °C 1 Woche
^a Sigma-Aldrich ist ein Beispiel für einen Hersteller von kolorimetrischen Substraten. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen. ANMERKUNG Alle Substrate müssen mit geeigneter Belüftung, speziellen Handschuhen und Schutzschild bearbeitet werden.					

6 Geräte und Materialien

Zusätzlich zur üblichen Laborausrüstung sind folgende Geräte erforderlich:

6.1 Siebe, mit einer Maschenweite von 2 mm, bis zu 5 mm je nach Bodenstruktur und -feuchtigkeit.

ANMERKUNG In Abhängigkeit von der Bodenstruktur können andere Maschenweiten verwendet werden.

6.2 Waage ($\pm 0,001$ g).

6.3 Kreisschüttler.

6.4 Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Polystyrolen, mit unbehandeltem flachem Boden und Deckeln.

6.5 Automatischer Probengeber für Wasser (optional).

ANMERKUNG Im Vergleich zum manuellen Pipettieren verringert ein automatischer Probengeber wesentlich die Messunsicherheit eingesetzter Volumina.

6.6 Mehrkanal-Mikro(liter)pipetten (50 μ l und 200 μ l).

6.7 Brutschränke, eingestellt auf $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ und $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

6.8 Mikrotiterplattenzentrifuge, mit einer Temperaturregelung bei $20 ^\circ\text{C}$ und einer Beschleunigung von $1\,500\text{ g}$.

6.9 Mikrotiterplatten-Spektralphotometer, mit Ablesung bei $405\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$, $540\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ und $650\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ (Monochromator oder $\text{BP} \pm 10\text{ nm}$).

7 Durchführung

7.1 Erstellung von Kalibrierkurven

7.1.1 Allgemeines

Kalibrierkurven erfordern mindestens die Doppel-, vorzugsweise die Dreifachbestimmung mehrerer Konzentrationen von para-Nitrophenol (PNP), Ammoniumchlorid (NH_4Cl) oder β -Naphthylamin; alle Volumina sind pro Vertiefung angegeben. Homogenisierungen werden mit einer Mikropipette und 2 oder 3 Ansaug-/Entleerungsvorgängen durchgeführt. Während der Erstellung der Kalibrierkurven muss die Einwirkung von Licht begrenzt werden. Beispiele für Kalibrierkurven sind in Anhang B angeführt.

7.1.2 PNP-Lösung

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wird die Stammlösung von PNP mit einer Konzentration von $0,36\text{ mmol/l}$ verwendet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden die für die Mehrfachbestimmung benötigten Volumina verteilt, um Konzentrationen von 0 nmol/ml , 14 nmol/ml , 29 nmol/ml , 72 nmol/ml , 140 nmol/ml , 220 nmol/ml , 290 nmol/ml und 360 nmol/ml zu erhalten (Tabelle 4).

Tabelle 4 — Erstellung der Kalibrierkurve für para-Nitrophenol in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen

[PNP] nmol/ml	0	14	29	72	140	220	290	360
PNP (μl)	0	5	10	25	50	75	100	125
Wasser (μl)	125	120	115	100	75	50	25	0

Um die gelbe Färbung von PNP sichtbar zu machen, werden $25\text{ }\mu\text{l}$ Wasser, $25\text{ }\mu\text{l}$ Calciumchlorid und $100\text{ }\mu\text{l}$ basischer Tris Base 100 mmol/l , pH-Wert 12, hinzugefügt. Nach dem Homogenisieren werden $200\text{ }\mu\text{l}$ in neue Platten überführt und die Messung der Extinktion erfolgt bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer.

7.1.3 β -Naphthylamin-Lösung

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wird die Arbeitslösung von β -Naphthylamin mit einer Konzentration von 1 mmol/l verwendet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden die benötigten Volumina verteilt, um Konzentrationen von 0 nmol/ml , 10 nmol/ml , 20 nmol/ml , 50 nmol/ml , 100 nmol/ml , 200 nmol/ml zu erhalten (Tabelle 5).

Tabelle 5 — Erstellung der Kalibrierkurve für β -Naphthylamin in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen

[β-Naphthylamin] nmol/ml	0	10	20	50	100	200
β -Naphthylamin (μ l)	0	1	2	5	10	20
Tris-Pufferlösung, 50 mmol/l, pH 7,5 (μ l)	50	49	48	45	40	30
Ethanol, 96%ig (μ l)	50	50	50	50	50	50

Um die Färbung von β -Naphthylamin sichtbar zu machen, werden 100 μ l angesäuertes Ethanol und 100 μ l p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMCA) hinzugefügt und gemischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur erfolgt die Messung der Extinktion bei 540 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich.

7.1.4 Ammoniumchlorid-Lösung

Die Stammlösung von Ammoniumchlorid mit einer Konzentration von 62 mmol/l wird 1/100 verdünnt und die Arbeitslösung mit 0,62 mmol/l (620 nmol/ml) wird für die Erstellung der Kalibrierkurve verwendet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden die für die Mehrfachbestimmung benötigten Volumina verteilt, um Konzentrationen von 0 nmol/ml, 6 nmol/ml, 16 nmol/ml, 31 nmol/ml, 62 nmol/ml, 155 nmol/ml, 233 nmol/ml und 310 nmol/ml (Tabelle 6) zu erhalten.

Tabelle 6 — Erstellung der Kalibrierkurve für Ammoniumchlorid in einer Mikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen

[NH₄Cl] nmol/ml	0	6	16	31	62	155	233	310
NH ₄ Cl (μ l)	0	2	5	10	20	50	75	100
Wasser (μ l)	200	198	195	190	180	150	125	100

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von NH₄Cl werden zu jeder Vertiefung 40 μ l Salicylat-Reagens hinzugefügt. Nach einer Reaktionsdauer von 3 min werden in jede Vertiefung 40 μ l Cyanurat-Reagens gegeben, jeweils gut homogenisiert und anschließend im Dunkeln für 30 min inkubiert (die Extinktion ist für zwei Stunden stabil). Nach der Inkubation werden die Platten mit einer Mikropipette homogenisiert (2 oder 3 Ansaug-/Entleerungsvorgänge), 200 μ l werden in neue Platten überführt und die Messung der Extinktionen erfolgt bei 650 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich.

7.2 Probenahme

7.2.1 Probenvorbereitung

7.2.1.1 Homogenisiere

Bodenproben sind nach den Festlegungen von ISO 18400-206 zu entnehmen und zu behandeln. Bei Mischproben, die vom Feld entnommen, homogenisiert und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 2 mm (bis zu 5 mm je nach Bodenstruktur und -feuchtigkeit) gesiebt wurden, wurde festgestellt, dass sie eine für Bodenproben angemessen geringe Messunsicherheit erreichten.

Zur Verbesserung der Verbindung zwischen den Aktivitäten *in-situ* sollten die Proben bis zu vier Tage bei $(15 \pm 2) ^\circ\text{C}$ gelagert werden. Wenn das nicht möglich ist, treten jedoch die geringsten Änderungen bei einer Lagerung bei $(-80 \pm 5) ^\circ\text{C}$ auf. Die Lagerung bei $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ vor oder nach dem Sieben ist nicht geeignet.

Der gesiebte Boden wird homogenisiert und Dreifachproben von genau 4 g werden eingewogen und in Stehkolben (30 ml bis 60 ml) gegeben. 25 ml deionisiertes Wasser und kreuzförmige Rührstäbchen werden hinzugefügt. Die Behälter werden verschlossen und der Inhalt wird 10 min in einem Orbitalschüttelgerät (250 min^{-1}) homogenisiert.

7.2.1.2 Vorbereitung von Proben-Platten

In die Stehkolben werden kreuzförmige Rührstäbchen gegeben und die Bodensuspension muss während des Pipettierens gerührt werden. Für die Verteilung von parallelen Ansätzen eines festgelegten Volumens nach Tabelle 7 (Teil A) jeder Bodensuspension in jeweils vier Vertiefungen von Mikrotiterplatten werden mehrkanalige Mikropipetten (ein Kanal bis drei Kanäle) verwendet und auf jeder Platte wird ein Deckel angeordnet. Drei Vertiefungen sind Analysenpunkte und eine Vertiefung stellt die Blindprobe (zum Aufzeigen chemischer Wechselwirkungen mit Verbindungen im Boden) dar. Es wird die gleiche Anzahl von Platten vorbereitet, wie Enzyme untersucht werden (eine Platte = je ein Enzym).

ANMERKUNG 1 Ein Beispiel für ein Mikrotiterplattenschema ist in Bild 1 beschrieben.

ANMERKUNG 2 Es besteht die Möglichkeit, dass für humushaltige Böden größere Spitzen zum Pipettieren benötigt werden.

S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
S1at	S1bt	S1cT	S2aT	S2bT	S2cT	S3aT	S3bT	S3cT	S4aT	S4bT	S4cT
S4a	S4b	S4c	S5a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
S4a	S4b	S4c	S5a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
S4a	S4b	S4c	S5a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
S4at	S4bt	S4cT	S5aT	S6aT	S6cT	S7aT	S7bT	S7cT	S8aT	S8bT	S8cT

Legende

S1 Probennummer
a, b, c dreifacher Ansatz der Probe
T Kontroll-Vertiefung für jeden Boden

Bild 1 — Beispiel für die Anordnung der Proben für jedes Enzym in Platten

7.2.2 Substratzugabe

Eine einfache Organisation liegt vor, wenn eine Platte für ein Enzym verwendet wird. Wenn alle Proben in Platten verteilt sind, werden Mehrkanal-Mikropipetten zum Verteilen der jeweiligen Substrate in dreifacher Ausführung und zum Homogenisieren durch zwei oder drei Ansaug-/Entleerungsvorgänge verwendet; anschließend werden die Mikrotiterplatten (Tabelle 7, Teil A) inkubiert. Nach der Inkubation werden die Reaktionen gestoppt, die Platten 5 min bei 1 500 g zentrifugiert und die Überstände in neue Platten überführt. Anschließend wird mit einem Spektralphotometer für Mikrotiterplatten die Extinktion gemessen. In Tabelle 7, Teil B, sind die Protokolle für alle Enzymmessungen zusammengefasst.

Tabelle 7 — Spezifische experimentelle Einzelheiten für Messungen der Enzymaktivität

A INKUBATION	ARN	ARS	β -GAL	α -GLU	β -GLU	NAG	PHOS PAC PAK	URE
Bodenlösung (µl)	125							50
Substrat (µl)	25							40
deionisiertes Wasser (µl)	0							150 (+40 µl in Kontroll- Vertiefungen)
Inkubationsdauer	2 h	4 h	2 h	1 h	1 h	1 h	0 h 30	3 h
Inkubations- temperatur	37 °C							25 °C

A INKUBATION	ARN	ARS	β -GAL	α -GLU	β -GLU	NAG	PHOS PAC PAK	URE
B STOP-REAKTION								
Stop-Reaktion	<u>in jeder Vertiefung:</u> 150 μ l Ethanol, 96%ig Homogenisieren	<u>in jeder Vertiefung:</u> 25 μ l CaCl ₂ 100 μ l Tris, pH-Wert 12 Homogenisieren						<u>in jeder Vertiefung:</u> 40 μ l Salicylat-Reagens 40 μ l Cyanurat-Reagens Homogenisieren
Substrat	25 μ l in Kontroll-Vertiefungen	25 μ l in Kontroll-Vertiefungen						
Inkubation								30 min, RT (Raumtemperatur), im Dunkeln
Zentrifugation	5 min, 1 500 <i>g</i>							
Überführung	100 μ l	200 μ l						
Nachweis	100 μ l angesäuertes Ethanol 100 μ l DMCA 20 min, RT (Raumtemperatur), im Dunkeln							
Messung	λ = 540 nm	λ = 405 nm						λ = 650 nm

ANMERKUNG 1 Die Inkubationstemperatur wirkt sich auf die Reaktionsgeschwindigkeiten aus und das Optimum hängt von den Enzymen ab. Für spezifische Zwecke kann eine andere Temperatur als die in dem vorliegenden Dokument beschriebene Temperatur verwendet werden, z. B. die *in-situ*-Temperatur.

ANMERKUNG 2 In Bezug auf die Urease-Aktivität ist es notwendig, das freie, durch die Harnstoff-Lösung eingebrachte Ammonium quantitativ zu bestimmen und von dem nach der Inkubation des Bodens quantitativ bestimmten Ammonium zu subtrahieren, um das speziell durch die Urease freigesetzte Ammonium zu erhalten. Eine Harnstoffkontrolle wird aus 40 μ l Harnstoff, 200 μ l deionisiertem Wasser, 40 μ l Salicylat-Reagens und 40 μ l Cyanurat-Reagens hergestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation werden 200 μ l in neue Vertiefung überführt und die Extinktion wird bei 650 nm bestimmt.

Nach der Inkubation werden die Reaktionen in Übereinstimmung mit den enzyspezifischen Protokollen (Tabelle 7) gestoppt.

7.2.3 Extinktionsmessungen

7.2.3.1 Messungen von Enzymaktivitäten mit PNP als Reaktionsprodukt (ARS, β -GAL, α -GLU, β -GLU, NAG, PHOS, PAC, PAK)

Die Zugabe von 25 μ l Calciumchlorid und 100 μ l basischer Tris-Pufferlösung, pH-Wert 12, stoppt die Reaktion und ist die entscheidende Maßnahme, um Kolloide zu entfernen, die zu einer Trübung in Lösungen führen, und den pH-Wert für die quantitative Bestimmung von PNP zu erhöhen. 25 μ l Substrat werden in Kontroll-Vertiefungen gegeben und mit zwei oder drei Ansaug-/Entleerungsvorgängen gemischt. Zudem werden die Platten fünf Minuten bei 1 500 *g* und 20 °C zentrifugiert und 200 μ l des Überstands werden in eine neue Platte überführt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei $\lambda = 405$ nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich.

7.2.3.2 Messungen von Arylamidase-Aktivitäten (ARN)

Nach der Inkubation werden in alle Vertiefungen (einschließlich Kontrollen) 150 μ l Ethanol, 96%ig, und 25 μ l Substrat-Lösung in die Kontroll-Vertiefungen hinzugefügt. Die Platte wird fünf Minuten bei 1 500 *g* zentrifugiert und 100 μ l Überstand werden in eine neue Platte überführt. Zur Bestimmung der Menge an gebildetem Naphthylamin werden 100 μ l angesäuertes Ethanol und 100 μ l DMCA in alle Vertiefungen hinzugefügt und mittels Mikropipette (zwei Ansaug-/Entleerungsvorgänge) gemischt. Nach 20 min erfolgt die Messung der Extinktion bei 540 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer, welches im UV und sichtbaren Wellenlängenbereich misst.

7.2.4 Messungen von Urease-Aktivitäten

Nach einer 3-stündigen Inkubation werden zu jeder Vertiefung, einschließlich Kontrollen, 40 μ l Salicylat-Reagens hinzugefügt. Nach einer Reaktionsdauer von 3 min werden in jede Vertiefung 40 μ l Cyanurat-Reagens gegeben. Die kolorimetrische Reaktion erfolgt in 30 min und ist für zwei Stunden stabil. Zudem werden die Platten fünf Minuten bei 1 500 *g* und 20 °C zentrifugiert und 200 μ l des Überstands werden in eine neue Platte überführt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei $\lambda = 650$ nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich.

8 Berechnung der Ergebnisse

Die Kalibrierkurve wird durch Auftragen der nanomolaren Konzentration (nmol/l) von PNP, β -Naphthylamin bzw. Ammoniumchlorid gegen die Extinktion erstellt. Die PNP-, β -Naphthylamin- bzw. Ammoniumchlorid-Konzentration der Blindprobe (C_b) und der Probe (C_s) werden aus der Kalibrierkurve abgelesen.

Beispiele für Kalibrierkurven sind in Anhang B angeführt.

Das Ergebnis wird durch Subtraktion des Messwertes der Blindprobe von der Dreifachbestimmung der Probe und Multiplikation der Differenz mit dem Verdünnungsfaktor (*D*) und Bodenvolumen (V_{ss}) sowie Division durch die Reaktionszeit und Trockenmasse der Probe (W_{ds}) berechnet.

$$A = \frac{(C_s - C_b) \times D \times V_{ss}}{RT \times W_{ds}} \quad (1)$$

Dabei ist

A die Enzymaktivität in mU/g trockene Probe (nmol/min/g trockene Probe);

C_s die Konzentration des in der Probe gebildeten Produkts (nmol/ml);

- C_b die Konzentration des in der Blindprobe gebildeten Produkts (nmol/ml);
- D die Verdünnung der Probe in der Mikrotiterplatte;
- V_{ss} das Volumen der Probenlösung (ml);
- RT die Reaktionszeit (min);
- W_{ds} die Masse der trockenen Probe (g).

9 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden als Millieinheit für ein Gramm trockenen Boden angegeben, was je Minute und g Trockenmasse des Bodens der Probe freigesetzten nmol PNP, β -Naphthylamin oder Ammoniumchlorid entspricht. Die für jede Angabe notwendigen Messungen, die Bestimmung der Trockenmasse in Prozent, müssen aufgeführt werden.

ANMERKUNG Die praktischere und häufig für Enzymaktivität verwendete Einheit ist Einheiten (U) = $1 \mu\text{mol min}^{-1}$. Bei Böden wird die Aktivität als Millieinheit für ein Gramm trockener Boden (mU/g DS) angegeben.

Bodeneigenschaften variieren aufgrund der Geographie, des Klimas und der Bodennutzung stark. Die Auswertung der Ergebnisse kann sich derzeit nicht auf festgelegte Grenzwerte für jede Enzymaktivität stützen. Der Versuchsaufbau muss Vergleiche mit einem Kontrollboden oder zwischen Proben von relevanten Standorten ermöglichen.

10 Gültigkeitskriterien

a) Die Kalibrierkurve ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind (entsprechend den in Anhang B zusammengefassten Ergebnissen des Ringversuchs):

- $r^2 \geq 0,990$;
- die Extinktion für den Bereich der PNP-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,04 \text{ bis } 1,8] \pm 10 \%$;
- die Extinktion für den Bereich der β -Naphthylamin-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,06 \text{ bis } 2,3] \pm 10 \%$;
- die Extinktion für den Bereich der Ammonium-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,05 \text{ bis } 1,6] \pm 10 \%$.

b) Bezüglich der Proben:

- der CV in Prozent (% CV) der Dreifachbestimmungen muss $\leq 15 \%$ sein;
- die Extinktion der Harnstoff-Blindprobe muss $\leq 0,2$ sein;
- bei den Urease-Messungen muss der Leerwert der Probe ≤ 1 sein;
- die Differenzen zwischen der Extinktion für Analyse und Leerwert der Probe müssen in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit und Wiederholpräzision des Spektralphotometers $\geq 0,02$ bis $0,05$ sein.

11 Methodenvvalidierung Ringversuch

Die Zusammenfassung des internationalen Ringversuchs ist in Tabelle 8 enthalten und die gesamten Daten der Ringversuche sind in Anhang B beschrieben.

Tabelle 8 — Zusammenfassende Auswertung der Ringversuche

	α-GLU	β-GLU	PHOS	PAC	PAK	ARS	β-GAL	NAG	URE	ARN
CV _r	4,0 bis 27,7 %	2,4 bis 15,2 %	4,2 bis 9,7 %	4,3 bis 13,0 %	3,8 bis 14,1 %	2,7 bis 10,4 %	3,9 bis 18,4 %	5,4 bis 23,3 %	5,5 bis 16,2 %	4,3 bis 13,1 %
CV _R	9,7 bis 17,9 %	9,5 bis 24,0 %	27,4 bis 36,5 %	12,6 bis 23,0 %	5,7 bis 23,3 %	15,5 bis 30,5 %	21,7 bis 32,6 %	9,8 bis 19,6 %	14,0 bis 35,9 %	15,9 bis 31,9 %

(Abkürzungen: CV_r: Variabilitätsbereich der mittleren intralaboratorischen Variationskoeffizienten für alle Labore (berechnet für jede Aktivität unter Berücksichtigung aller Böden und eines einzelnen Labors). CV_R: Variabilitätsbereich der mittleren Interlaborkoeffizienten der Variation für alle Böden (berechnet für jede Aktivität unter Berücksichtigung aller Laboratorien und eines einzelnen Bodens).

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

- a) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 20130:2018;
- b) eine angemessene Identifizierung der Probe;
- c) Einzelheiten zu Lagerungstemperatur und -dauer;
- d) Bodenart, eine physikalische und chemische Charakterisierung des Bodens, Wassergehalt, Bodentemperatur zum Zeitpunkt der Probenahme (pH-Wert der Bodenprobe);
- e) angewendete Inkubationsbedingungen;
- f) Prüfergebnisse;
- g) sämtliche Einzelheiten, die nicht in diesem Dokument festgelegt oder optional sind, sowie sämtliche Wirkungen, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.