DIN EN ISO 21479

ICS 13.080.30 Einsprüche bis 2020-03-10

Entwurf

Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Zusammensetzung von Fettsäuren in Blättern zur Beurteilung der Bodenbeschaffenheit (ISO 21479:2019); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21479:2019

Soil quality –
Determination of the effects of pollutants on soil flora –
Leaf fatty acid composition of plants to assess soil quality (ISO 21479:2019);
German and English version prEN ISO 21479:2019

Qualité du sol –
Détermination des effets des polluants sur la flore du sol –
Composition en acides gras foliaires des plantes utilisées pour évaluer la qualité du sol (ISO 21479:2019);
Version allemande et anglaise prEN ISO 21479:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-10 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 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21479:2019) 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 (Niederlande) gehalten wird.

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. 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 11269-1:2012	siehe	DIN EN ISO 11269-1:2013-03
ISO 11269-2:2012	siehe	DIN EN ISO 11269-1:2013-05
ISO 22030:2005	siehe	DIN EN ISO 22030:2011-09
ISO 29200:2013	siehe	DIN ISO 29200:2014-05

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

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

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

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

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

– Entwurf –

CEN/TC 444

Datum: 2019-12

prEN ISO 21479:2019

CEN/TC 444

Sekretariat: NEN

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 3

Vorwort ... 4

Einleitung ... 5

1 Anwendungsbereich ... 6

2 Normative Verweisungen ... 6

3 Begriffe und Abkürzungen ... 6
3.1 Begriffe ... 6
3.2 Abkürzungen ... 7

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens ... 7

5 Geräte und Reagenzien ... 7
5.1 Geräte ... 7
5.2 Reagenzien ... 8

6 Probenahmestrategien ... 8

7 Probenahme von Blattgewebe ... 9

8 Gewinnung, Extraktion und Analyse von Fettsäure-Methylestern (FAME) ... 9
8.1 Prüfung auf Verunreinigungen ... 9
8.2 Gewinnung und Extraktion von FAME aus Pflanzenblättern ... 9
8.3 Analyse der FAME ... 10

9 Prüfbericht ... 11
9.1 Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 21479 ... 11
9.2 Beschreibung des Standorts und der analysierten Flächen ... 11
9.3 Blattprobenahme ... 12
9.4 Fettsäurezusammensetzung ... 12
9.5 Schlussfolgerung ... 12

Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs ... 13

Anhang B (informativ) Beurteilung der Bodenbeschaffenheit durch Bestimmen des Omega-3-Index von *Lactuca-sativa*-Keimlingen, die *ex situ* unter kontrollierten Bedingungen gezogen werden ... 21

Anhang C (informativ) Pflanzenarten, die bereits erfolgreich zur Beurteilung der Böden von (durch organische Verbindungen und/oder Metalle) verunreinigten Standorten verwendet wurden ... 23

Anhang D (informativ) Veränderung des Omega-3-Index in Abhängigkeit von Entnahmezeit, Pflanzengröße und Blattentwicklung ... 24

Anhang E (informativ) Einfluss der Blattgewebemenge auf die FAME-Zusammensetzung ... 26

Anhang F (informativ) Beispiel für ein Chromatogramm, das bei der FAME-Analyse von Blattgewebe erhalten wurde ... 27

Anhang G (informativ) Empfohlenes mathematisches Verfahren zur Bewertung von Böden verschiedener Flächen, wenn einige der beprobten Pflanzenarten nicht auf allen Flächen vorkommen ... 28

Literaturhinweise ... 31

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Europäisches Vorwort

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

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen 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.

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.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Einleitung

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

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

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

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

— Für die Fettsäureanalyse werden nur 20 mg bis 50 mg frisches Blattgewebe je Probe benötigt. Dadurch werden die Pflanzen nicht zerstört, und es ist unproblematisch, auf einer bestimmten Fläche genügend Gewebe von einer Art zu erhalten.

— Proben von Pflanzengewebe können vor der Analyse mehrere Tage in Methanol bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

— Es ist nicht erforderlich, an einem Standort eine bestimmte Art zu suchen, und grundsätzlich kann jede Art beprobt werden (wobei oft unter den repräsentativsten ausgewählt wird) (Abschnitt 6).

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

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

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

1 Anwendungsbereich

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

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

Das Verfahren ist anwendbar auf:

— Böden von verunreinigten Standorten;

— verbesserte Böden;

— Böden nach Altlastensanierungen;

— Böden, auf die Abfallprodukte (z. B. Flüssigmist, Gülle, Schlamm oder Kompost) aufgebracht wurden.

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

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe und Abkürzungen

3.1 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter https://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: verfügbar unter http://www.electropedia.org/

3.1.1
Omega-3-Index
% C18:3 / (% C18:0 + % C18:1 + % C18:2)

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

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

3.2 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Abkürzungen.

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

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

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

5 Geräte und Reagenzien

5.1 Geräte

Zusätzlich zur üblichen Laborausrüstung sind die folgenden Geräte erforderlich.

5.1.1 Schere zum Schneiden der Blätter.

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

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

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

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

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

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

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

ANMERKUNG 1 Die Untersuchungen, die zur Erstellung dieses Dokuments führten, wurden meist unter Verwendung eines Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 Serie II oder Hewlett Packard 7890A) mittels einer Carbowax-Kapillarsäule mit einer Länge von 15 m, einem Durchmesser von 0,53 mm und einer Filmdicke von 1,2 µm (Altech, Deerfield, IL., USA) oder einer DB-WAX-Kapillarsäule mit einer Länge von 15 m, einem Durchmesser von 0,53 mm und einer Filmdicke von 1 µm (Agilent, Santa Clara, CA., USA) mit Helium als Trägergas durchgeführt.[1]

5.2 Reagenzien

5.2.1 Methanol (99 %) und Schwefelsäure (H_2SO_4), Bestandteile der Umesterungslösung.

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

6 Probenahmestrategien

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

Je nach Ziel der Untersuchung können von jeder interessierenden Fläche eine oder mehrere Angiospermenarten als Proben entnommen werden. Bei den meisten Untersuchungen empfiehlt es sich, mehrere Arten (wenn möglich drei bis acht) zur Beurteilung eines bestimmten Standorts (beispielsweise Boden einer Deponie für Metallabfälle) heranzuziehen. Bei einer Beschränkung auf nur eine Art ist es möglich, dass zufälligerweise Proben einer hochresistenten (oder einer empfindlichen) Art genommen werden. Je größer die Anzahl der untersuchten Arten, desto besser repräsentieren die Ergebnisse die „Bodenbeschaffenheit“ für die gesamte Phytozönose. Deshalb werden in diesem Fall zunächst die verschiedenen Flächen des Standorts erkundet, und die zu untersuchenden Arten werden, soweit möglich, unter den repräsentativsten Beispielen ausgewählt, die auf allen Flächen vorkommen. Es sollte jeweils ein Blatt (oder ein Stück eines Blattes, wenn ganze Blätter zu groß sind, um vollständig in 1 ml Methanol/H_2SO_4eingetaucht zu werden, siehe 8.2) von vier bis acht Individuen je Art von jeder Fläche als Probe genommen werden. Einige Pflanzenarten, die bereits erfolgreich zur Beurteilung der Böden von (durch organische Verbindungen und/oder Metalle) verunreinigten Standorten verwendet wurden, sind in Anhang C angegeben.

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

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

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

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

7 Probenahme von Blattgewebe

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

— Da bei der Umesterungsreaktion Fettsäure-Methylester aus biologischen Proben gewonnen werden und die Gegenwart von Wasser die Hydrolyse der gebildeten Ester zur Folge hat, **muss ein Vorhandensein von Fremdwasser auf den biologischen Proben vermieden werden**. Wenn die Blätter nass sind, ist es also erforderlich, vor einer Probenahme das Wasser auf ihrer Oberfläche mit einem saugfähigen Papier zu entfernen.

— Blätter, die unter hydrischem Stress (Trockenheit) oder biotischem Stress (Krankheitserreger) stehen, werden nicht als Proben genommen. Es sollten nur grüne Blätter entnommen werden.

— Die Blätter werden an Pflanzen ähnlicher Größe entnommen. Dementsprechend sollten für die Messung des Omega-3-Index nicht auf einer Fläche Blätter von niedrigen Pflanzen und auf einer anderen Blätter von hohen Pflanzen entnommen werden (siehe Anhang D und [12]).

— Vorsorglich wird empfohlen, nur voll entwickelte Blätter zu entnehmen und von in Entwicklung befindlichen abzusehen (siehe Anhang D).

— Wenn bei einer bestimmten Art nur ein Teil des Blattes als Probe entnommen wird, wird bei allen Individuen der gleiche Teil (beispielsweise der distale Teil) des Blattes entnommen.

— Vorsorglich wird empfohlen, alle Pflanzen innerhalb von 2 h bis 3 h zu beproben (siehe Anhang D).

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

8.1 Prüfung auf Verunreinigungen

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

Jeden Kontakt der Lösungen mit Kunststoff vermeiden – diese Empfehlung gilt nicht für die Pipettenspitzen, die zum Aufnehmen der Lösung von Methanol/H_2SO_4 (40/1) oder Hexan verwendet werden.

8.2 Gewinnung und Extraktion von FAME aus Pflanzenblättern

Die Blattgewebe (ungefähr 1 cm × 1 cm) werden in die Kulturröhrchen (siehe 5.1.3) eingebracht, die 1 ml einer Lösung von Methanol/H_2SO_4 (40/1) enthalten. Die Röhrchen werden mit einer Schraubkappe verschlossen, die mit einer Polytetrafluorethylendichtung versehen ist. Die Röhrchen werden 1 h lang bei 80 °C erwärmt. Da Methanol bei einem Druck von 1 Atmosphäre bei 72 °C siedet, ist es zwingend erforderlich, jegliches Verdampfen zu vermeiden, sodass sich in den Röhrchen der Sättigungsdampfdruck einstellt. Deshalb ist es wichtig, dass sie dicht verschlossen sind. Außerdem ist es erforderlich, sich während der Dauer der Erwärmung durch Sichtprüfung (zunächst 20 min lang alle 5 min, danach alle 10 min) zu versichern, dass die Lösung von Methanol/H_2SO_4 nicht siedet. Wenn während der Erwärmung der Inhalt des Röhrchens siedet, wird das Röhrchen in Eis gesteckt, um es abzukühlen, anschließend wird die Kappe vollständig abgeschraubt und wieder festgeschraubt. Falls erforderlich, wird das Volumen durch Zugabe von Methanol wieder auf 1 ml eingestellt. Wenn der Inhalt danach immer noch siedet, wird der Inhalt des defekten Röhrchens in ein anderes Röhrchen mit einer anderen Kappe überführt. Die Fettsäurezusammensetzung von Geweben in Röhrchen, in denen die Lösung von Methanol/H_2SO_4 während der Erwärmung (fast) vollständig verdampft ist, sollte nicht analysiert werden.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Nach 1 h Erwärmung bei 80 °C werden die Röhrchen abgekühlt (z. B. auf Eis gelegt). Zuerst werden 750 µl 99 % Hexan, danach 1,5 ml H_2O zugegeben. Es wird von Hand 20 s lang kräftig geschüttelt. Die Verwendung eines Vortex-Schüttlers sollte vermieden werden. Die Röhrchen werden bei 200 g bis 300 g 5 min bis 10 min lang zentrifugiert, um zwei Phasen zu erhalten. Mit einer Pasteurpipette werden 200 µl bis 400 µl Hexan (obere Phase) in ein GC-Fläschchen mit Einsatz überführt. Das Fläschchen wird mit einer Schraubkappe mit Silikonseptum verschlossen. Ein Aufnehmen der unteren Phase sollte unbedingt vermieden werden, da das Wasser die Gaschromatographiesäule irreversibel beschädigt.

Es wird darauf hingewiesen, dass bei Befolgung dieser Verfahrensvorschrift die Fettsäurezusammensetzung nicht von der in das Röhrchen eingebrachten Blattgewebemenge abhängt (siehe Anhang E).

8.3 Analyse der FAME

Die gaschromatographische Analyse wird mit einer Kapillarsäule durchgeführt, die zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Fettsäure-Methylestern mit 14 Kohlenstoffatomen bis 22 Kohlenstoffatomen, bei allen möglichen Längen der aliphatischen Kette, geeignet ist, um die gesättigten Ester, die einfach ungesättigten Ester, die zweifach ungesättigten Ester und die dreifach ungesättigten Ester jeweils voneinander zu trennen. Die FAME werden durch Vergleichen der Retentionszeiten mit Standards der Methylester C16:0; C16:1; C16:3, C18:0; C18:1; C18:2 und C18:3 identifiziert.

Nach der gaschromatographischen Analyse (siehe Anhang F) werden die Flächen jener Peaks im Chromatogramm bestimmt, die C16:0, C16:1, C16:3 (falls vorhanden), C18:0, C18:1, C18:2 und C18:3 entsprechen. Die Ergebnisse werden als prozentualer Anteil jedes FAME $F_i$angegeben. Der prozentuale Anteil wird berechnet, indem die Fläche S_i des Peaks für den FAME F_i dividiert wird durch die Summe der Flächen der Peaks, die C16:0, C16:1, C16:3 (falls vorhanden), C18:0, C18:1, C18:2 und C18:3 entsprechen, d. h.

$$\%F_i = 100 \times S_i/(S_{\mathrm{C16:0}} + S_{\mathrm{C16:1}} + S_{\mathrm{C16:3}} + S_{\mathrm{C18:0}} + S_{\mathrm{C18:1}} + S_{\mathrm{C18:2}} + S_{\mathrm{C18:3}}) \quad (1)$$

Ergebnisse von Analysen, bei denen der Verdacht auf eine Verunreinigung besteht, sollten verworfen werden. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Fettsäurezusammensetzung zu stark von der für grüne Blattgewebe von Angiospermen üblichen Fettsäurezusammensetzung abweicht (siehe Anhang B, Anhang E, Anhang F und [6] [9-14] [18]).

— % C18:0, % C16:1 und % C18:1 sollten jeweils kleiner sein als 10 %;

— die Anteile von C16:0 und C18:2 sollten jeweils zwischen 5 % und 30 % liegen;

— der Anteil von C16:3 sollte zwischen 0 % und 30 % liegen und

— der Anteil von C18:3 sollte höher sein als 40 % der Summe (% C16:0 + % C16:1 + % C16:3 + % C18:0 + % C18:1 + % C18:2 + % C18:3).

Ebenso sind Ergebnisse nicht zu berücksichtigen, wenn ein oder mehrere zusätzliche Peaks, die nicht C16:0, C16:3, C18:0, C16:1, C18:1, C18:2 oder C18:3 entsprechen, mit signifikanten Anteilen auftreten, z. B. ein Peak oder mehrere Peaks mit einer Fläche S, die größer ist als $0{,}15 \times (S_{\mathrm{C16:0}} + S_{\mathrm{C16:1}} + S_{\mathrm{C16:3}} + S_{\mathrm{C18:0}} + S_{\mathrm{C18:1}} + S_{\mathrm{C18:2}} + S_{\mathrm{C18:3}})$.

Je Fläche können von einer oder mehreren Pflanzenarten Proben genommen werden. Wenn nur eine Pflanzenart analysiert wird oder wenn alle betrachteten Pflanzenarten in allen Probenahmebereichen vorkommen, reichen in der Regel statistische Standardverfahren zur Analyse der Ergebnisse aus. Die parametrischen Analysen (z. B. t-Test) für solche Daten setzen voraus, dass die Daten einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen, dass die Behandlungen unabhängig erfolgen und dass die Varianz über die verschiedenen Behandlungen gleich ist. Es sollte geprüft werden, ob diese Voraussetzungen erfüllt sind. Wenn die Daten diesen Voraussetzungen genügen, darf die Analyse der Ergebnisse fortgesetzt werden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Andernfalls sollten nichtparametrische Tests verwendet werden. Lediglich bei statisch signifikanten Unterschieden zwischen Flächen wird dem Boden jeder Fläche eine Bewertung zugeordnet.

Wenn nur eine Art analysiert wird und signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten des Omega-3-Index nach Flächen festgestellt werden, sollte die Bewertung einer Fläche definiert werden als Mittelwert des Omega-3-Index für diese Fläche, dividiert durch den höchsten Mittelwert des Omega-3-Index, der für den gesamten Standort, alle Flächen eingeschlossen, bestimmt wird.

Die Werte des Omega-3-Index können von der analysierten Pflanzenart abhängen. Deshalb sollten dann, wenn mehrere Pflanzenarten gemeinsam analysiert werden, normierte Werte des Omega-3-Index verwendet werden. Deshalb wird das Verhältnis X_p/X_{max} berechnet, wobei X_p für den Omega-3-Index steht, der für die einzelne Pflanze p gemessen wurde, und X_{max} für den höchsten Omega-3-Index steht, der für die Individuen derselben Art an einem gegebenen Standort, alle Flächen eingeschlossen, erhalten wurde.

Wenn mehrere Pflanzenarten analysiert werden, wobei alle Pflanzenarten in allen Probenahmebereichen vorkommen, und wenn zwischen den Mittelwerten des Verhältnisses X_p/X_{max}, jeweils auf die Fläche bezogen (alle Individuen einer Art eingeschlossen), signifikante Unterschiede festgestellt werden, ist die Bewertung einer Fläche definiert als Mittelwert von X_p/X_{max} für diese Fläche (alle Individuen aller Arten eingeschlossen), dividiert durch den höchsten Mittelwert von X_p/X_{max}, der an einem gegebenen Standort, alle Flächen eingeschlossen, bestimmt wird.

Zu beachten ist, dass es auch dann möglich ist, Flächen zu bewerten und zu vergleichen, wenn nicht alle untersuchten Pflanzenarten in allen Probenahmebereichen vorkommen, sofern (i) alle Arten, von denen auf einer gegebenen Fläche Proben genommen wurden, auf mindestens einer anderen Fläche vorkamen und beprobt wurden und (ii) alle Flächenpaare mindestens eine Art, von der Proben genommen wurden, gemeinsam haben. Das in diesem Fall zur Berechnung der Bewertungen der Flächen anzuwendende Verfahren ist in [10] vollständig beschrieben und in Anhang G erläutert.

Es sollte beachtet werden, dass es sich um relative Bewertungen handelt: Bei einem gegebenen Standort erhält die Fläche mit der „besten Bodenbeschaffenheit“ eine Bewertung von 1, den anderen Flächen wird eine niedrigere Bewertung gegeben. Auf der Grundlage der bisher vorliegenden Erfahrungen [6] [9]-[14] [18] wird zwischen den verschiedenen negativen Auswirkungen des Bodens auf Pflanzen in der Regel wie folgt unterschieden: geringe oder keine Auswirkung (Bewertung $\geq 0{,}93$), mittlere Auswirkung ($0{,}93 >$ Bewertung $\geq 0{,}85$), starke negative Auswirkung ($0{,}85 >$ Bewertung $\geq 0{,}7$) und sehr starke negative Auswirkung ($0{,}7 >$ Bewertung), im Verhältnis zu dem Boden der Fläche mit einer Referenzbewertung von 1.

9 Prüfbericht

Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

9.1 Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 21479

9.2 Beschreibung des Standorts und der analysierten Flächen

Wenn verfügbar, wird dem Prüfbericht eine detaillierte Karte des betreffenden Standorts beigefügt. Für jede einzelne Fläche wird angegeben, ob wenige oder viele Pflanzenarten vorkommen und welche Arten am häufigsten sind. Es wird darauf hingewiesen, dass detaillierte Informationen über physikalische und chemische Eigenschaften für die Auswertung der Ergebnisse hilfreich sind (siehe Einleitung).

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

9.3 Blattprobenahme

— Für jede einzelne Fläche die beprobten Pflanzenarten (wenn möglich: Klassifizierung nach Linné, Varietät, Fundort), die Anzahl der Individuen jeder dieser Arten und gegebenenfalls nicht vorhandene Individuen;

— den beprobten Blattteil (distal, proximal) und die beprobten Blätter (voll entwickeltes Blatt, ältestes Blatt usw.) und

— jede spezifische Besonderheit des Zustandes der beprobten Individuen (Entwicklungsstadium, Alter, Größe usw.), und gegebenenfalls Beschreibung von sichtbaren Schäden (Fotografien werden empfohlen).

9.4 Fettsäurezusammensetzung

— Gegebenenfalls fehlende Daten (zerbrochene Röhrchen, verunreinigte Probe usw.);

— die Fettsäurezusammensetzung jeder Probe und den Wert des Verhältnisses % C18:3 / (% C18:0 + % C18:1 + % C18:2), sein Mittelwert und seine Standardabweichung und,

— wenn mehrere Arten analysiert werden, das normierte Verhältnis % C18:3 / (% C18:0 + % C18:1 + % C18:2), sein Mittelwert und seine Standardabweichung für jede einzelne Art.

9.5 Schlussfolgerung

Schlussfolgerungen hinsichtlich der relativen Bodenbeschaffenheit der verschiedenen Flächen werden nach einer Analyse der Ergebnisse wie in 8.2 und 8.3 beschrieben gezogen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Anhang A
(informativ)

Ergebnisse des Ringversuchs

A.1 Allgemeines

An dem Ringversuch nahmen sechs Laboratorien (mit A, B, C, D, E und F bezeichnet) aus drei europäischen Ländern (Frankreich, Portugal Vereinigtes Königreich) teil.

Die Probenahmekampagne lief für alle Teilnehmer am 31. Mai 2017. Der untersuchte Standort (27 m × 19 m) befand sich in Léognan, nahe Bordeaux (Frankreich). Er wurde in mehrere Flächen (von 3 m × 6 m) unterteilt, wobei die Flächen 1 m voneinander getrennt waren. Die Blattgewebe wurden von Pflanzen gewonnen, die auf drei verschiedenen Flächen wuchsen: Fläche 2, Fläche 7 und Fläche 20. Diese Flächen wiesen unterschiedliche Metallgehalte auf (siehe Tabelle A.1), da auf die Flächen 2 und 7 zwischen 1974 und 1993 aufgeschlossener und entwässerter kommunaler Klärschlamm ausgetragen wurde (jährlich 10 t/ha bei Fläche 2 und alle zwei Jahre 100 t/ha bei Fläche 7), während auf Fläche 20 kein Klärschlamm ausgetragen wurde.

Tabelle A.1 — Gesamtgehalt an metallischen Spurenelementen (mg/kg)

Fläche	**Gesamtgehalt an Metallen** (mg/kg)					
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
2	6,01	21,9	85,8	23,6	179	977
7	10,3	33,8	135	39	307	1 790
20 (Kontrolle)	0,62	10,9	34,2	4,03	48,6	55,5

Jedes der Laboratorien A, B, C, D, E und F synthetisiert, extrahiert und analysiert FAMEs im Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM, Bordeaux). Die von den verschiedenen Untersuchenden in Bordeaux erhaltenen Ergebnisse sind mit den Buchstaben A1, B1, C1, D1, E1 bzw. F1 gekennzeichnet.

Zusätzlich haben die Laboratorien A, B, C und D FAMEs in ihren eigenen Laborräumen synthetisiert, extrahiert und analysiert; die entsprechenden Ergebnisse sind mit A2, B2, C2 bzw. D2 gekennzeichnet.

Nur drei Pflanzenarten wurden auf allen Flächen angetroffen und analysiert: *Plantago lanceolata*, *Hypochaeris radicata* und *Medicago sativa*. Für jede Analysenreihe (A1 bis F1 und A2 bis D2) entnahmen die Laboratorien unabhängig voneinander fünf Blattstücke von fünf Individuen jeder Art (Bild A.1 und Bild A.2).

Nach der Analyse der Fettsäuren wurde der Mittelwert der normierten Omega-3-Index-Werte für jede einzelne Fläche, alle Arten eingeschlossen, berechnet.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

a) Bei *Plantago lanceolata*

b) Bei *Hypochaeris radicata*

c) Bei *Medicago sativa*

Legende

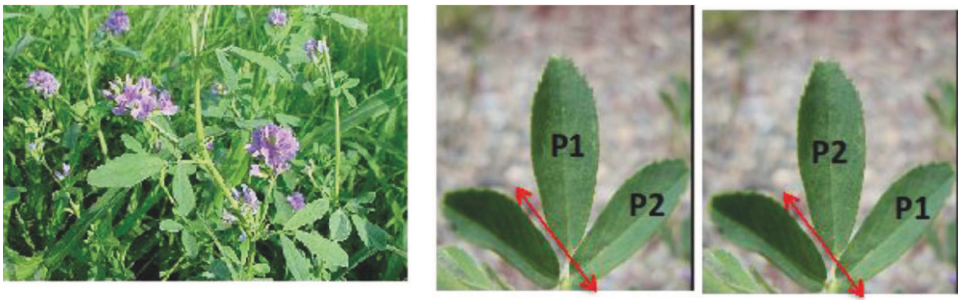
P gibt die Teile des Blattes an, die als Probe von den Untersuchenden genommen wurden, die die Analysen ausschließlich im LBM durchführten.

Bild A.1 — Beprobte Pflanzenarten und Vorgehensweise bei der Blattprobenahme für die Analysen, die ausschließlich im LBM durchgeführt wurden (eine Probe)

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

a) Bei *Plantago lanceolata*

b) Bei *Hypochaeris radicata*



c) Bei *Medicago sativa*

Legende

P1 und P2 repräsentieren die Teile des Blattes, die als Probe von den Untersuchenden genommen wurden, die Analysen sowohl im LBM (mit den Teilen P1) als auch in den eigenen Laborräumen (mit den Teilen P2) durchgeführt haben.

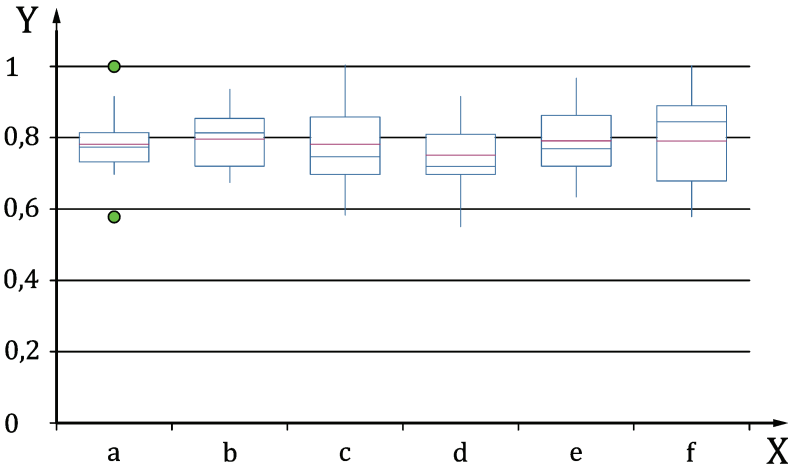
Bild A.2 — Verwendete Pflanzenarten und Vorgehensweise bei der Blattprobenahme für die Analysen, die im LBM und in den anderen Laboratorien durchgeführt wurden (zwei Proben)

AVA Documents
Document Sharing Hub

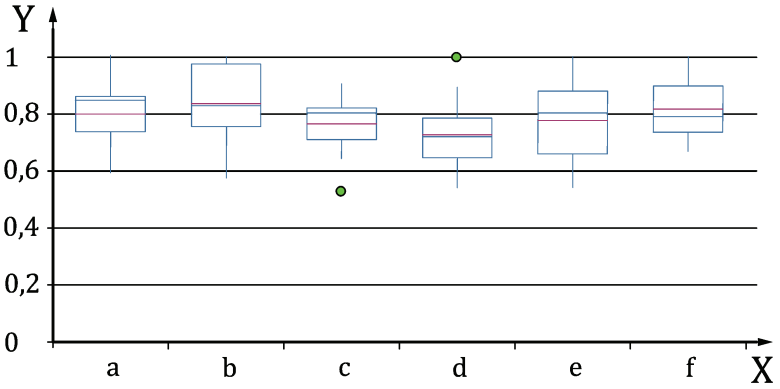
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

A.2 Ergebnisse, die in Bordeaux von sechs Laboratorien erhalten wurden

Bild A.3 zeigt, dass alle Laboratorien für die Fläche 20 und 7 einen ungefähr gleichen Mittelwert der normierten Omega-3-Index-Werte ermittelten, nämlich: 0,781 ± 0,016 (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0{,}883$) für Fläche 20 und 0,786 ± 0,037 (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0{,}269$) für Fläche 7. Grüne Punkte stellen Ausreißer dar.



Fläche 20



Fläche 7

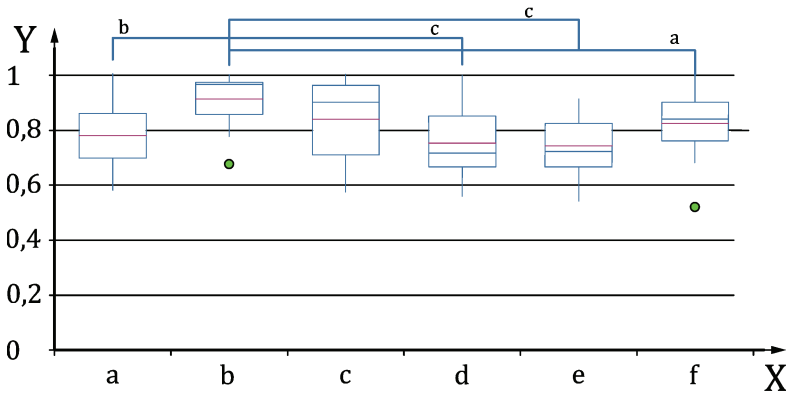
Legende

X am Ringversuch teilnehmendes Laboratorium
Y normierter Omega-3-Index

Bild A.3 — Normierter Omega-3-Index, der von allen Laboratorien im LBM für die Flächen 20 und 7 erhalten wurde

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02

Im Gegensatz dazu wurde vom Ringversuchsteilnehmer B für Fläche 2 ein höherer Omega-3-Index bestimmt, der leicht, aber signifikant höher als die übrigen ist (siehe Bild A.4)..



Legende

X am Ringversuch teilnehmendes Laboratorium
Y normierter Omega-3-Index
Kruskal-Wallis-Test:
a $p < 0{,}02$
b $p < 0{,}01$
c $p < 0{,}002$

Bild A.4 — Normierter Omega-3-Index, der von allen Laboratorien im LBM für Fläche 2 erhalten wurde

Fazit: Mit Ausnahme eines Untersuchenden bei einer Fläche (geringfügig höhere Werte des Omega-3-Index) haben alle Laboratorien für jede Fläche die gleichen normierten Omega-3-Indexwerte erhalten. Da die Werte sehr eng beieinander lagen, ist es nach wie vor möglich, dass unter den 18 analysierten Flächen (drei Flächen × sechs Laboratorien) die höchsten und die niedrigsten Werte des normierten Omega-3-Index gleichmäßig über die 17 Flächen verteilt waren, während eine Fläche zufällig einen geringfügig höheren Höchstwert aufwies.

A.3 Ergebnisse, die von denselben Untersuchenden in verschiedenen Laboratorien erhalten wurden

Wie bereits erwähnt, synthetisierten, extrahierten und analysierten die Ringversuchsteilnehmer A, B, C und D die FAMEs aus den vorliegenden Proben in ihren eigenen Laboratorien. Leider verwendete das Laboratorium D keine geeignete GC-Säule, sodass es nicht möglich war, diese Ergebnisse zu berücksichtigen. Zudem wurde vom Laboratorium C die Fettsäurezusammensetzung durch GC-MS und nicht durch GC-FID analysiert. Im Folgenden werden zwar die vom Ringversuchsteilnehmer C mittels GC-MS erhaltenen Ergebnisse erörtert, sie können jedoch nicht direkt mit den in Bordeaux mittels GC-FID erhaltenen Ergebnissen verglichen werden.

Tabelle A.2 zeigt, dass jedes Laboratorium in Bordeaux und in seinen eigenen Laborräumen für jede Fläche die niedrigsten (orangefarbene Tabellenfelder) und die höchsten (grüne Tabellenfelder) Werte an demselben Individuum (alle Arten eingeschlossen) ermittelte, mit Ausnahme eines einzigen Werts (blaues Tabellenfeld). Außerdem ermittelten die beiden Laboratorien A und B in Bordeaux (LBM) und in ihren eigenen Laborräumen ungefähr gleiche normierte Omega-3-Indexwerte: Über alle Arten und alle Flächen hinweg betrugen die Verhältnisse A1/A2 und B1/B2 bei den Proben, die von den Laboratorien A und B analysiert wurden, $1{,}008 \pm 0{,}088$ ($n = 45$) bzw. $1{,}025 \pm 0{,}079$ ($n = 45$). Dieses Ergebnis belegt die geringe Variabilität der Messungen, wenn die gleiche Probe (d. h. dieselben Blätter) an zwei verschiedenen Orten (von demselben Untersuchenden) analysiert wurde.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21479:2020-02