DIN EN ISO 29200

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2020-03-10
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO 29200:2014-05

Entwurf

Bodenbeschaffenheit – Beurteilung der genotoxischen Wirkungen auf höhere Pflanzen – Mikrokern-Prüfung mit Vicia faba (ISO 29200:2013); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 29200:2019

Soil quality –
Assessment of genotoxic effects on higher plants –
Vicia faba micronucleus test (ISO 29200:2013);
German and English version prEN ISO 29200:2019

Qualité du sol –
Évaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs –
Essai des micronoyaux sur Vicia faba (ISO 29200:2013);
Version allemande et anglaise prEN ISO 29200:2019

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 48 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 29200:2013 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 29200:2019 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 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 10381-6	siehe	DIN ISO 10381-6
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11269-2:2012	siehe	DIN EN ISO 11269-2:2013-05

Änderungen

Gegenüber DIN ISO 29200:2014-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

a) Überführung in eine internationale Norm, wobei die europäische Norm vollständig überarbeitet wurde;

b) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

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 ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

– Entwurf –

CEN/TC 444

Datum: 2019-12

prEN ISO 29200:2019

CEN/TC 444

Sekretariat: NEN

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

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

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

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 29200:2020-02

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 3
Vorwort ... 4
Einleitung ... 5
1 Anwendungsbereich ... 6
2 Normative Verweisungen ... 6
3 Begriffe ... 6
4 Kurzbeschreibung ... 7
5 Pflanzen, Prüfausrüstung und Reagenzien ... 7
5.1 Ausrüstung ... 7
5.2 Prüforganismen ... 7
5.3 Referenzsubstanz ... 7
5.4 Reagenzien ... 8
6 Materialien ... 8
6.1 Herstellung des zu untersuchenden Bodens ... 8
6.2 Vorbereitung der Samen ... 9
6.3 Versuchsdurchführung ... 10
6.4 Prüfumgebung ... 12
6.5 Vorbereitung der Zellen ... 12
7 Auswertung der Ergebnisse ... 14
7.1 Angaben der Daten ... 14
7.2 Statistische Analyse ... 14
7.3 Interpretation der Ergebnisse ... 14
8 Gültigkeitskriterien ... 14
9 Prüfbericht ... 14
Anhang A (informativ) Zusammensetzung des Hoagland-Mediums ... 16
Anhang B (informativ) Prüfung von den Böden zugesetzten Chemikalien ... 17
Anhang C (informativ) Ergebnisse des im Rahmen von NF T 90-327 durchgeführten Ringversuchs ... 18
Anhang D (informativ) Ergebnisse des mit der Referenzsubstanz und einem industriellen verunreinigten Boden durchgeführten Ringversuchs ... 20
Literaturhinweise ... 24

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 29200:2013 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 29200:2019 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 29200:2013 wurde von CEN als prEN ISO 29200:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

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.

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

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Einleitung

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

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

1 Anwendungsbereich

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

ISO 10390, *Soil quality — Determination of pH*

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

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

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

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

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

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

BEISPIEL Kompost, Schlamm, Abfall, Chemikalien

3.2
Mitotischer Index
Anzahl der sich teilenden Zellen je 1 000 beobachteter Zellen, wenn alle Phasen der Mitose mitberücksichtigt werden, von der Prophase (wenn die Chromosomen zu kondensieren beginnen) bis zur Telophase (wenn das Chromatin der beiden Kerne an den Polen der Zelle geformt und die Dekondensation beendet ist)

3.3
Prüfmischung
Mischung des Prüfmaterials (Boden, Kompost, Schlamm, Abfall oder Chemikalie) mit dem Kontrollboden

4 Kurzbeschreibung

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

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

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

5 Pflanzen, Prüfausrüstung und Reagenzien

5.1 Ausrüstung

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

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

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

5.2 Prüforganismen

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

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

5.3 Referenzsubstanz

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

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

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

5.4 Reagenzien

5.4.1 Carnoy-Lösung

Carnoy-Lösung wird aus Eisessig und Ethanol in den jeweiligen Volumenanteilen von 25 % und 75 % zusammengestellt und ist zur Verwendung frisch herzustellen.

5.4.2 Hydrolyse-Lösung

Eine HCl-Lösung mit einer Konzentration von 1 mol/l ermöglicht die Hydrolyse der Wurzeln.

5.4.3 Färbelösung

Die Färbelösung zur spezifischen Färbung von DNA ist 1 % Orcein in 45 % Essigsäure verdünnt. Diese Mischung wird für 10 min zum Sieden erhitzt und nach Abkühlen filtriert. Nach jeder Verwendung ist es wichtig, die Färbelösung zu filtrieren, um die Orcein-Kristallbildung zu verhindern, damit diese unter dem Mikroskop nicht mit den Mikrokernen verwechselt werden.

ANMERKUNG Andere spezifische DNA-Färbelösungen können verwendet werden.

5.4.4 Hoagland-Medium

Nährsubstrat, Zusammensetzung ist in Anhang A angegeben.

5.4.5 Intermediat-Lösemittel

Dimethylsulfoxid (DMSO), mit einer maximalen Konzentration von 1 %.

ANMERKUNG Jedes andere geeignete mit Wasser mischbare Lösemittel, dessen genotoxische Unbedenklichkeit festgestellt wurde, darf verwendet werden.

6 Materialien

6.1 Herstellung des zu untersuchenden Bodens

6.1.1 Chemische Substanzen

Chemische Substanzen dürfen geprüft werden: ihre Vorbereitung wird in Anhang B erklärt.

6.1.2 Böden und Bodenmaterialien

Unabhängig von der Art des zu prüfenden Bodens (entnommen von einem verunreinigten Standort oder sanierten Boden, oder anderen Bodenmaterialien sowie Kompost, Schlamm, Abfall, Düngemittel) sollte der pH-Wert nach Sieben in einem Bereich sein, der für *Vicia faba* nicht toxisch ist. Die zu prüfenden Böden sollten durch ein 4 mm Sieb gesiebt, sorgfältig vermischt und so kurz wie möglich im Dunkeln bei (4 ± 2) °C nach ISO 10381-6 unter Verwendung von Gefäßen, die Verluste der Bodenverunreinigungen durch Verflüchtigung und Sorption an die Behälterwand minimieren, gelagert werden. Der pH-Wert des Bodens sollte nicht korrigiert werden.

Für jeden zu prüfenden Boden sollten die folgenden Eigenschaften bestimmt werden:

— Klassifizierung der Bodenart;

AVA Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

— pH-Wert nach ISO 10390;

— Wassergehalt nach ISO 11465;

— Wasserrückhaltevermögen nach ISO 11269-2:2012,

— Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260;

— Gehalt an organischer Substanz nach ISO 10694.

Die Bodenmischungen mit einem Feuchtegehalt von 70 % des Wasserrückhaltevermögens werden in Plastiktöpfe überführt.

6.1.3 Kontrollboden

Als Kontrollboden können entweder Referenz- oder natürliche Standardböden verwendet werden, z. B. LUFA- Böden[1)], zuvor bei Raumtemperatur luftgetrocknet, gesiebt zwischen 2 mm und 5 mm, mit Ton (< 2 µm)-Gehalt < 25 %, Lehm (2 µm bis 50 µm)-Gehalt < 45 %, Gehalt an organischer Substanz zwischen 1,5 % und 5 %, pH_{Wasser} zwischen 5 und 8.

Beim Vergleich von Böden bekannter und unbekannter Beschaffenheit sollten der Kontrollboden und der zu prüfende Boden derselben Bodenart angehören und hinsichtlich aller anderen Aspekte, mit Ausnahme der zu untersuchenden Chemikalie oder Verunreinigung, so ähnlich wie praktisch möglich sein. Tatsächlich können signifikante Unterschiede in den Bodeneigenschaften, mit Ausnahme des Vorliegens der Verunreinigungen, zu Unterschieden in der Pflanzenzellteilung führen, und somit bei der Häufigkeit der Mikrokerne falsch positiv Ergebnisse hervorrufen.

ANMERKUNG Auch wenn der Mitotische Index bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 nicht veränderlich ist, ist es für eine bessere genotoxische Beurteilung der Chemikalien empfehlenswert, einen Kontrollboden mit einem pH_{Wasser} zwischen 5 und 8 zu verwenden.

6.1.4 Wasserextrakte des Bodens

Die Wasserextrakte der Böden oder Bodenmaterialien werden so bald wie möglich nach Erhalt der Proben im Labor nach den in ISO/TS 21268-1 oder ISO/TS 21268-2 oder EN 14735 beschriebenen Eluierungsverfahren hergestellt. Die erhaltenen Eluate dürfen jedoch nicht filtriert, sondern können innerhalb von 2 h dekantiert werden. In diesem Fall wird die überstehende Phase genommen und im Dunkeln bei einer Temperatur von (4 ± 3) °C bis zur Durchführung der Prüfung gelagert. Die Prüfung ist maximal 24 h nach dem Eluierungsschritt durchzuführen. Das Hoagland-Medium wird für die Negativkontrolle und für die Herstellung der Verdünnungen der Wasserextrakte verwendet.

6.2 Vorbereitung der Samen

Samen (ungefähr dreimal so viele wie benötigt) werden aus dem Vorrat der Samen, der bei 4 °C im Dunkeln gelagert wird, ausgewählt. Ein Keimungsschritt ist notwendig, um Seitenwurzeln zu erhalten: Die Samen werden mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und für eine Dauer von 6 h bis 24 h bei Raumtemperatur in entmineralisiertes Wasser eingetaucht, um sie zu hydratisieren. Die Samenschale wird entfernt und die Samen werden bei (24 ± 1) °C in kontinuierlich angefeuchteter Watte (nicht einem Chlorierungsschritt unterzogen) zum Keimen vertikal im Dunkeln gelassen.

---

1) LUFA-Böden sind ein Beispiel für ein kommerziell erhältliches geeignetes Produkt. Diese Angabe dient zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

ANMERKUNG Anderes Keimungsmaterial darf verwendet werden: Vermiculit, Torf usw.

Nach ungefähr drei Tagen werden nur die Samen ausgewählt, deren Hauptwurzel eine Länge zwischen 3 cm und 5 cm besitzt. Ihre Spitze (etwa 5 mm) wird abgeschnitten, um das Wachstum der Hauptwurzel zu hemmen und das Wachstum der Seitenwurzel anzuregen.

Für die Festphasen-Exposition werden die Samen mit der Hauptwurzel von Beginn der Exposition der Seitenwurzel an in den Boden gebracht.

Für die Flüssigphasen-Exposition werden die Samen so in das Gefäß mit Nährsubstrat (Hoagland-Medium (5.4.4)) bei einer Temperatur von (24 ± 1) °C platziert, dass nur die Wurzel eintaucht, um die Keimung der Seitenwurzel hervorzurufen. Das zuvor mit Sauerstoff angereicherte Medium ist alle 24 h zu erneuern. Die Seitenwurzeln der Samen erreichen nach einer Dauer von vier Tagen eine Länge von 1 cm bis 2 cm; die Samen mit diesen Seitenwurzeln werden für die Durchführung der Prüfung verwendet.

Dieser Keimungsschritt der *Vicia faba* Samen, der für beide Arten der Exposition notwendig ist, kann 4 Tage bzw. 8 Tage für Festphasen- bzw. Flüssigphasen Exposition vor der Prüfung beginnen werden.

6.3 Versuchsdurchführung

6.3.1 Böden und Bodenmaterialien

Die Verdünnungen der Prüfmischungen werden innerhalb einer geometrischen Reihe mit einem Faktor der 2 nicht übersteigt gewählt und haben einen großen Konzentrationsbereich (z. B. von 0,01 % bis 100 %) abzudecken. Diese Mischungen werden durch Verdünnung des Bodens mit einem Referenzboden hergestellt.

Jede Prüfung muss eine Negativkontrolle ohne Prüfprobe und eine Positivkontrolle (siehe 5.3) beinhalten.

Die direkte Exposition der Pflanzenorganismen mit den verschiedenen Bodenkonzentrationen wird durchgeführt, indem die gekeimten Samen (mindestens drei je Verdünnung) in einen Plastiktopf mit 200 g des zu prüfenden Bodens und/oder Mischungen (siehe Bild 1) während der Dauer der Exposition zwischen 3 Tagen und 5 Tagen platziert werden, so dass mindestens zehn Wurzeln mit einer Länge von 1 cm erhalten werden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Bild 1 — Verfahren der direkten Exposition der *Vicia faba* Samen

6.3.2 Wasserextrakte des Bodens

Die Konzentrationen der zu prüfenden Probe werden innerhalb einer geometrischen Reihe mit einem Faktor der 2 nicht übersteigt gewählt und haben einen großen Konzentrationsbereich (z. B. von 0,01 % bis 100 % für Matrices) abzudecken. Diese Konzentrationsreihe wird durch Verdünnung der Probe mit dem zuvor mit Sauerstoff angereicherten Hoagland-Medium (siehe Anhang A) hergestellt.

Jede Prüfung muss eine Negativkontrolle ohne Prüfprobe und eine Positivkontrolle (siehe 5.3) beinhalten.

Während der Prüfung sind die verschiedenen zu analysierenden Lösungen vor Exposition der Pflanzenorganismen auf eine Temperatur von (24 ± 1) °C zu bringen und zu homogenisieren. Dies wird durchgeführt, in dem die gekeimten Samen (mindestens drei je Konzentration) in ein Glasgefäß platziert werden mit ausreichendem Durchmesser, um den Kontakt der Wurzelspitzen mit den Wänden des Gefäßes während der gesamten Dauer der Exposition so weit wie möglich zu vermeiden. Die Wurzeln werden in ein Volumen von mindestens 200 ml Prüflösung eingetaucht (siehe Bild 2).

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Bild 2 — Verfahren der wässrigen Exposition der *Vicia faba* Samen

Die Dauer der Exposition muss mindestens 30 h betragen, welche der ungefähren Dauer des Zellzyklusses entspricht. Um sicher zu gehen, dass der Zellzyklus beendet ist, und für eine bessere Durchführbarkeit beträgt jedoch die optimale Dauer der Exposition für die Erfassung von genotoxischen Wirkungen 48 h.

6.4 Prüfumgebung

Die Prüfungen werden in einer Klimakammer (mit einer Intensität von mindestens 5 000 lx und 16/8 Photoperiode) bei einer Temperatur von (24 ± 1) °C durchgeführt. Die Prüfung der Flüssigphase kann auch, wenn nötig, im Dunkeln ausgeführt werden (z. B. Maleinsäurehydrazid).

6.5 Vorbereitung der Zellen

Am Ende der Expositionsdauer werden die Wurzeln aus dem Wasserextrakt entnommen oder aus dem Boden vorsichtig entfernt. Danach werden sie mit entionisiertem Wasser gereinigt und die letzten zwei Zentimeter der Seitenwurzeln (etwa 10 Wurzeln je Samen, willkürlich gewählt) werden in Carnoy-Lösung bei 4 °C für eine Dauer von mindestens einer Nacht stehengelassen. Diese Wurzelspitzen können langfristig in 70 %igem Ethanol für eine spätere Betrachtung aufbewahrt werden oder im Fall der sofortigen Betrachtung hydrolysiert werden.

Die Wurzelspitzen werden für 10 min in destilliertes Wasser gelegt, in die Hydrolyse-Lösung bei 60 °C für 6 min eingetaucht und in destilliertes Wasser für wenige Minuten zurücküberführt.

Zur Betrachtung der Wurzelzellen wird eine Wurzelspitze nach vorsichtigem Abwischen auf einen Objektträger gelegt. Mit Hilfe eines Skalpells wird der erste Millimeter, der der Wurzelkappe und der meristematischen Region entspricht, entfernt sodass nur der zweite Millimeter erhalten bleibt, der aus den Tochterzellen nach der Mitose aufgebaut ist. Die Auszählung der Mikrokerne ist in dieser speziellen Zellenregion durchzuführen (siehe Bild 3). Alle diese Schritte können auf einem schwarzen Hintergrund durchgeführt werden, um die verschiedenen Zellregionen zu sehen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02

Das Färben der DNA wird durch Zerdrücken der Wurzelspitzen erreicht, nachdem ein Tropfen Orcein hinzugefügt wurde; der Objektträger kann dann positioniert und zusammengepresst werden, um eine einzelne Schicht aus Zellen zu erhalten.

Es wird empfohlen mindestens zwei Zellverteilungen (erhalten von zwei verschiedenen Wurzeln) je Samen durchzuführen.

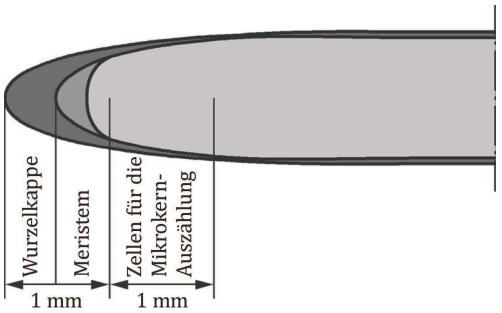

Bild 3 — Längsschnitt der *Vicia faba* Wurzel mit der Wurzelkappe, den Meristem und der Zellenregion, die zur Mikrokern-Auszählung auszuwählen ist

Die Auszählung sollte vor deren Untersuchung unter Blindversuchsbedingungen durchgeführt werden, so dass die Person, die die Untersuchung durchführt, beim Zählen der Mikrokerne nicht beeinflusst wird (siehe Bild 4). Die Mikrokerne sich teilender Zellen dürfen für die Bestimmung der Häufigkeit der Mikrokerne nicht betrachtet werden. Die Ergebnisse werden als Anzahl der Mikrokerne je 1 000 Zellen in der Interphase angegeben.

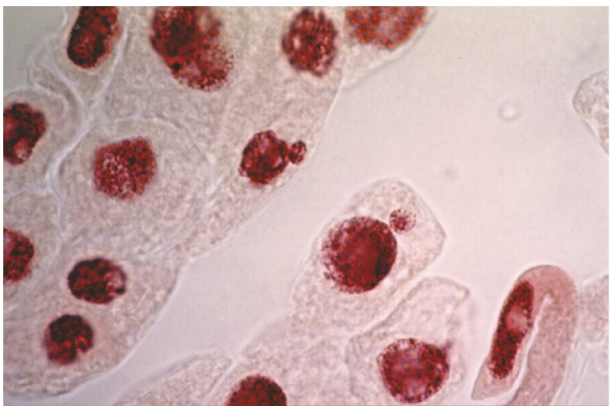

Bild 4 — Mikrokerne in den Zellen der Wurzelspitzen von *Vicia faba* (x 400)

Während des Zählens der Mikrokerne ist es sehr empfehlenswert, den ordnungsgemäßen Prozess der Zellteilung (notwendige Bedingung für die Bildung der Mikrokerne) durch Bestimmen des Verhältnisses der Zellen in der Mitose (allgemein bekannt als Mitotischer Index) zu bestätigen. Eine genotoxische Wirkung kann durch eine zytotoxische Wirkung (toxisch in Bezug auf die Zellfunktionen) maskiert werden, welches eine Unterschätzung des genotoxischen Potenzials der Probe verursachen würde. Die Ergebnisse werden als Anzahl der Zellen in Teilung je 1 000 beobachteter Zellen angegeben. Alle Phasen der Mitose werden mitberücksichtigt, von der Prophase (wenn die Chromosomen zu kondensieren beginnen) bis zur Telophase (wenn das Chromatin der beiden Kerne an den Polen der Zelle geformt und die Dekondensation beendet ist).

Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger findet unter einer 400-fachen Vergrößerung statt. Mindestens zwei Objektträger für jede der drei Wiederholungen für jede Konzentration werden vorbereitet. Ausgehend davon, dass 1 000 Zellen je Objektträger betrachtet werden, sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für mindestens 6 000 Zellen je Konzentration zu berechnen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 29200:2020-02