

DIN ISO 18187

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2014-12-31

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Beschaffenheit von Bodenproben –
Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von
Arthrobacter globiformis (ISO/DIS 18187:2014)**

Soil quality- Quality of solid samples- Solid contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2014)

Qualité du sol- Qualité des échantillons solides- Essai de contact en utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis* (ISO/DIS 18187:2014)

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2014-10-31 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	10
5 Reagenzien und Material.....	10
5.1 Testorganismen	10
5.2 Kontrollsubstrate	11
5.2.1 Allgemeines	11
5.2.2 Kontrolle für Böden	11
5.2.3 Kontrolle für Abfälle	12
5.2.4 Kontrolle für Sedimente	12
5.3 Prüfsubstrate.....	12
5.4 Chemikalien	13
6 Geräte.....	15
7 Durchführung	16
7.1 Herstellung von Verdünnungen	16
7.2 Referenzsubstanz und Herstellung der Positivkontrolle.....	16
7.3 Durchführung des Kontakttests.....	16
7.3.1 Allgemeines	16
7.3.2 Belüftung	17
7.3.3 Deaktivierung	17
7.3.4 Herstellung des Inokulums	17
7.3.5 Bebrütung und Messung der Fluoreszenz	17
7.4 Störungen	18
8 Auswertung	19
8.1 Berechnung	19
8.1.1 Relative Fluoreszenz	19
8.1.2 Bestimmung des Prozentsatzes der Hemmung	19
8.2 Angabe der Ergebnisse	19
9 Gültigkeit des Tests	20
10 Statistische Analyse	21
11 Prüfbericht	21

Anhang A (informativ) Vorläufige Ergebnisse des Ringversuchs	23
A.1 Ziel.....	23
A.2 Hintergrund	23
A.3 Prüfgut und -verfahren.....	23
A.4 Datenanalyse	24
A.5 Auswertung der vorläufigen Ergebnisse	25
Anhang B (informativ) Vorbereitung der Testorganismen	29
B.1 Allgemeines	29
B.2 Anlegen der Stammkultur.....	29
B.3 Gefriertrocknen von Bakterien.....	29
B.4 Qualitätskontrolle	30
Anhang C (informativ) Prüfung von chemischen Substanzen	31
C.1 Allgemeines	31
C.2 Kontroll- und Prüfsubstrat.....	31
C.3 Untersuchung von Chemikalien	31
Literaturhinweise	33

Nationales Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ aufgestellt, dessen Sekretariat von den Niederlanden (NEN) gehalten wird. Für Deutschland war der NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ an der Bearbeitung beteiligt.

Es ist erforderlich, bei den Arbeiten nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

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

ISO 1773	siehe	DIN ISO 1773
ISO 5667-15	siehe	DIN EN ISO 5667-15
ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 7027	siehe	DIN EN ISO 7027
ISO 10381-6	siehe	DIN ISO 10381-6
ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11268-2	siehe	DIN ISO 11268-2
ISO 11277	siehe	DIN ISO 11277
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465
ISO 15799	siehe	DIN ISO 15799
ISO/TS 20281	siehe	DIN ISO/TS 20281

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-15, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 15: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Schlamm- und Sedimentproben*

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN EN ISO 7027, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung*

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

DIN ISO 1773, *Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyer-, Rund- und Stehkolben, enghalsig*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

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

DIN ISO 10390, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes*

DIN ISO 10694, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse)*

E DIN ISO 11268-2, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida/Eisenia andrei) — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung*

DIN ISO 11277, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren mittels Siebung und Sedimentation*

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

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

DIN ISO/TS 20281, *Wasserbeschaffenheit — Anleitung für die statistische Auswertung von Ökotoxizitätsdaten*

Bodenbeschaffenheit — Beschaffenheit von Bodenproben — Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis*

Einleitung

Der in der vorliegenden Internationalen Norm beschriebene miniaturisierte Feststoffkontaktversuch mit *Arthrobacter globiformis* ermöglicht die vorläufige Beurteilung von Feststoffen (d. h. Sediment, Boden und Abfälle) innerhalb von 6 h. Das Prinzip des Versuchs beruht auf der Hemmung der Dehydrogenaseaktivität eines hinzugefügten Testorganismus, die durch biologisch verfügbare toxische Substanzen in Sediment-, Boden- und Abfallproben hervorgerufen wird. Das ist ein ökologisch relevanter Versuch, sofern eine ubiquitäre Bodenbakterienart mit einer hohen Affinität zu Oberflächen verwendet wird [15], [6], deren Dehydrogenasen an verschiedenen biologischen Mechanismen beteiligt sind, die die Unversehrtheit der Bakterien erfordern (z. B. Atmungsketten). Außerdem wurde festgestellt, dass dieser Parameter (Hemmung der Dehydrogenaseaktivität) recht empfindlich gegenüber toxischen Substanzen ist [18], [10], [13], [14].

Insgesamt ist dieser Versuch nicht arbeitsaufwändig, schnell, kostengünstig und empfindlich, wobei Ergebnisse erhalten werden, die die physikalische und chemische Beurteilung natürlicher Proben verbessern, indem sie eine schnelle Identifizierung der biologischen Auswirkungen ermöglichen.

Der miniaturisierte Feststoffkontaktversuch beruht auf dem in [7] festgelegten Feststoffkontaktversuch.

Das vorliegende Dokument beruht außerdem auf ISO/DIS 10871.

Die vorläufigen Ergebnisse eines Ringversuchs zur Bewertung der Prüfvariabilität zur Beurteilung verschiedener Abfall- und Bodenproben sowie chemischer Verbindungen sind in Anhang A angegeben.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Schnellverfahren zur Beurteilung von Feststoffproben in einer aeroben Suspension durch Bestimmung der Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* unter Verwendung des Redox-Farbstoffes Resazurin fest.

Das Verfahren ist für die Beurteilung der Auswirkung von wasserlöslichen und feststoffgebundenen nicht flüchtigen Verunreinigungen in natürlichen Proben, wie z. B. Böden, Sedimenten und Abfällen, geeignet. Der Test führt innerhalb von 6 h zu einem Ergebnis und kann deshalb zum Screening potentiell verunreinigten Materials eingesetzt 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 5667-15, *Water quality — Sampling — Part 15: Guidance on the preservation and handling of sludge and sediment samples*

ISO 5667-16, *Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples*

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

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 11268-2, *Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction of Eisenia fetida/Eisenia andrei*

ISO 11277, *Soil quality — Determination of particle size distribution in mineral soil material — Method by sieving and sedimentation*

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Kontaktzeit

Dauer, für die die Bakterien einer Feststoffsuspension ausgesetzt sind

3.2

Negativkontrolle

Probe eines Kontrollsubstrats mit einer Mischung bekannter Lösungen (destilliertes Wasser, Medium B oder Inokulum)

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird verwendet, um die Analyse zu normen.

3.3

Positivkontrolle

Probe eines Kontrollsubstrats mit einer Mischung bekannter Lösungen (destilliertes Wasser, Medium B oder Inokulum) und einer Referenzsubstanz

Anmerkung 1 zum Begriff: Sie wird verwendet, um die Empfindlichkeit des Testorganismus zu überprüfen.

3.4

Leerwertprobe A

Leerwertprobe, die nach der Deaktivierung die Eigenfluoreszenz des Substrats angibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Leerwertprobe werden keine Bakterien hinzugefügt.

3.5

Leerwertprobe B

Leerwertprobe, die ohne Deaktivierung die natürliche Fluoreszenz des Substrats angibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Leerwertprobe werden keine Bakterien hinzugefügt.

3.6

Kontrollsubstrat

Referenz- oder Standardsubstrat, das als Kontrolle und als Medium zum Herstellen von Verdünnungs-/Konzentrationsreihen mit Prüfsubstraten oder einer Referenzsubstanz verwendet wird

BEISPIEL Quarzsand oder LUFA 2.2.

3.7

Prüfsubstrat

natürliches oder künstliches Substrat, das natürlich kontaminiert oder mit einer Prüfchemikalie aufgestockt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Prüfsubstrat ist das Prüfgut nach der Vorbereitung für die Prüfung (z. B. gesiebt) und/oder mit einem Kontrollsubstrat verdünnt.

3.8

Prüfgut

ursprüngliche Probe des Bodens, Sediments oder Abfalls, ohne Änderungen (z. B. Sieben)

3.9

Dehydrogenaseaktivität

Aktivität wasserstoffabspaltender Enzyme, die an vielen Energie- und Biosynthese-Stoffwechselprozessen (z. B. in der Atmungskette) beteiligt sind und die Integrität der Zelle erfordern [20]

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Enzyme können in der extrazellulären Umgebung Resazurin zu Resorufin reduzieren [6].

3.10

EC_x

Wirkungskonzentration für eine Wirkung von x %

Konzentration (Masseanteil) einer Prüfsubstanz oder Probe, die x % einer Wirkung an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer gegebenen Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle verursacht

BEISPIEL Eine EC₅₀ ist eine Konzentration, die eine Wirkung auf 50 % der exponierten Population an einem Endpunkt der Prüfung über eine festgelegte Kontaktzeit verursacht.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die EC_x wird als ein Prozentwert des zu prüfenden Bodens (Trockenmasse) je Bodenmischung (Trockenmasse) angegeben. Wenn Substanzen geprüft werden, wird die EC_x als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des Bodens in Milligramm je Kilogramm angegeben.

3.11

gefriergetrocknete Bakterien

Bakterienkultur, die durch das Entfernen von Wasser aus einer gefrorenen Zellsuspension durch Sublimation unter Unterdruck konserviert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die konservierten Kulturen können bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ gelagert werden. Nach der Rekonstitution (Wiederherstellung) mit sterilisiertem destilliertem Wasser (20 min bis 30 min bei 6°C) sind die Bakterien aktiv und gebrauchsfertig für den Test (7.3.4 b)).

3.12

Inokulum

Bakteriensuspension zum Beimpfen eines Nährmediums

3.13

Nährmedium

wässrige Nährstofflösung, die für das Bakterienwachstum notwendig ist

3.14

optische Dichte des Bakterieninokulums

Messung der Schwächung eines Lichtstrahls, der bei 600 nm durch eine Bakteriensuspension hindurchgeht (wird zur indirekten Bestimmung der Zellzahl angewendet)

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei einem Testverfahren mit Bakterien wird die Extinktion in der Regel in FAU (Formazin-Schwächungseinheiten) bei 600 nm gemessen (siehe [3]).

3.15

Testbeginn

Zeitpunkt, an dem die Substrate, Reagenzien und das Bakterieninokulum unmittelbar vor der Bebrütung und der Reaktionsdauer hergestellt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Fall bezieht sich das auf die Herstellung der Prüf- und Kontrollsubstrate für die Bebrütung (d. h. Tag 0, Tabelle 1).

3.16

Reaktionszeit

Dauer der Enzymreaktion (von der Zugabe der Resazurin-Lösung bis zum Ende der Reaktion)

3.17

Anstieg

Verhältnis der Änderung der relativen Fluoreszenz und der Reaktionszeit zwischen 15 min und 45 min

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Anstieg (angegeben in min^{-1}) resultiert aus dem Anpassen eines linearen Regressionsmodells an Fluoreszenzmessungen über die Zeit.

3.18**relative Fluoreszenz**

für jede Behandlung (Kontrolle und Test) gemessene Fluoreszenz nach der Subtraktion der Fluoreszenz der zugehörigen Leerwertprobe A

3.19**Stammkultur**

Bakterienkultur, die aus der von einem zertifizierten Laboratorium bezogenen Reinkultur eines Stammes erhalten wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Stammkultur dient im Testverfahren als Inokulum für die Vorkultur.

3.20**LID-Wert**

niedrigste unwirksame Verdünnung

niedrigster Wert des Verdünnungsfaktors (LID), für den die Prüfung keine ökotoxikologisch relevante Reduzierung ergibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der LID-Wert wird als der reziproke Wert der Verdünnung angegeben.

BEISPIEL Eine häufig angewendete Verdünnungsreihe ist 1/2/4/8/16 (= 100 %/50 %/25 %/12,5 %/6,25 % Prüfsubstrat zu Kontrollsubstrat). Ein LID-Wert von 8 entspricht einer Verdünnung von Bodenextrakt von 1:8.

4 Kurzbeschreibung

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

5 Reagenzien und Material**5.1 Testorganismen**

Der Testorganismus ist *Arthrobacter globiformis* (Conn 1928) Conn und Dimmick 1947 (Stammnummer ATCC 8010), der in Böden verbreitet ist, jedoch auch in einer großen Anzahl in Sedimenten vorkommt. *Arthrobacter*-Arten gehören zur Familie der Micrococcaceae. Das sind hauptsächlich obligat(orisch)e aerobe Organismen, auch wenn einige Arten bei einschränkenden Sauerstoffverhältnissen einen anaeroben Stoffwechsel aufweisen können [10]. *Arthrobacter* spp. sind chemoheterotroph und weisen pleomorphe Eigenschaften auf, da sie beim Eintreten in die stationäre Phase eine Änderung der Morphologie von stäbchenförmig zu kokkoid zeigen. Obwohl *Arthrobacter* grampositiv ist, kann es während der logarithmischen Phase gramnegativ gefärbt werden. Schwankungen der Zellwanddicke während des Bakterienwachstums können durch unterschiedliche Färbung der Granula zur Gram-Variabilität führen [21]. Diese Eigenschaft bedingt jedoch keine unterschiedliche Empfindlichkeit der Versuche, sofern während der Reaktionszeit ein Inokulum in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet wird. *Arthrobacter globiformis* ist der Risiko-gruppe I — nicht pathogener Organismus — zugeordnet.

Der Bakterienstamm kann aus handelsüblichen gefriergetrockneten oder flüssiggetrockneten Reagenzien erhalten oder von Kultursammlungen, z. B. Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Braunschweig, Germany, oder ARS Culture collection NCAUR, 1815 N,

University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, bezogen werden¹⁾ Die für Toxizitätsmessungen verwendeten Bakteriensuspensionen müssen frisch aus Stammkulturen hergestellt werden oder direkt aus einer gebrauchsfertigen gefriergetrockneten Charge verwendet werden. Das Anlegen der Stammkultur und der Prozess der Gefrier Trocknung der Bakterien sind in Anhang B beschrieben.

5.2 Kontrollsubstrate

5.2.1 Allgemeines

Die aus den nachstehend angeführten Möglichkeiten gewählten Kontrollsubstrate dienen zur Herstellung sowohl der Negativkontrollen (Zugabe von destilliertem Wasser; 5.2.2, 5.2.3, 5.2.4) als auch der Positivkontrollen (Zugabe der Referenzsubstanz, 7.2). Das Befeuchten des Kontrollsubstrates (Boden, Sediment oder Abfall) muss einen Tag oder zwei Tage vor Testbeginn erfolgen (siehe Tabelle 1). Die Substrate sind bis zum Beginn des Tests bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ zu lagern.

5.2.2 Kontrolle für Böden

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

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

BEISPIEL LUFA 2.2

- c) genormter künstlicher Boden oder Quarzsand (mit 50 % bis 75 % Sand mit einer Partikelgröße zwischen 0,063 mm und 2 mm).

Das als „künstlicher Boden“ [16] bezeichnete Substrat hat die folgende Zusammensetzung:

	Massenanteil in % bezogen auf Trockenmasse
— Fein gemahlener Sphagnum-Torf ohne sichtbare Pflanzenreste (Korngröße $\leq 1 \text{ mm}$)	5/10 %
— Kaolin, mit mindestens 30 % Kaolinit	20 %
— Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu 50 % bis 75 % eine Korngröße von 0,063 mm bis 2 mm aufweist)	69/74 %
— Kalziumkarbonat	1 %

ANMERKUNG Mit modifizierter Korngröße von Torf und Quarzsand hergestellter künstlicher Boden sollte genauer analysiert werden. Sind in diesem künstlichen Substrat Partikel geringer Dichte vorhanden (z. B. Torf), die auftreiben können, kann dies die Fluoreszenzmessung beeinflussen. Daher wird vorgeschlagen, 5 % Torf zu verwenden.

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