

DIN ISO 20130

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2017-10-04

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit
kolorimetrischen Substraten in Mikrotiterplatten (ISO/DIS 20130:2017);
Text Deutsch und Englisch**

Soil quality –

Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates (ISO/DIS 20130:2017);

Text in German and English

Qualité du sol –

Mesure de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats colorimétriques (ISO/DIS 20130:2017);

Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-08-04 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, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

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

Gesamtumfang 72 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort.....	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Symbole und Abkürzungen.....	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien.....	8
5.1 Pufferlösungen	8
5.1.1 Allgemeines	8
5.1.2 Trizma-Hydrochlorid, 50 mmol/l, pH-Wert 5,5	8
5.1.3 Trizma-Base, 50 mmol/l, pH-Wert 11.....	9
5.1.4 Trizma-Base, 50 mmol/l, pH-Wert 7,5.....	9
5.1.5 Trizma-Base, 100 mmol/l, pH-Wert 12	9
5.1.6 Calciumchlorid-Dihydrat, 0,5 mol/l.....	9
5.1.7 Salicylat-Reagens.....	9
5.1.8 Cyanurat-Reagens.....	10
5.1.9 Ethanol, 96%ig.....	10
5.1.10 Angesäuertes Ethanol (0,26 mol/l HCl).....	10
5.1.11 p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMCA) (3,5 mmol/l)	10
5.2 Substrate und Standards.....	11
5.2.1 Herstellung von Standardlösungen	11
5.2.2 Herstellung von Substratlösungen.....	11
6 Geräte und Materialien.....	13
7 Durchführung.....	13
7.1 Erstellung von Kalibrierkurven	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 PNP-Lösung.....	13
7.1.3 β -Naphthylamin-Lösung.....	14
7.1.4 Ammoniumchlorid-Lösung	14
7.2 Probenahme	15
7.2.1 Probenvorbereitung.....	15
7.2.2 Substratzugabe	16
7.2.3 Extinktionsmessungen	17
7.2.4 Messungen von Urease-Aktivitäten	18
8 Berechnung der Ergebnisse.....	18
9 Angabe der Ergebnisse	19
10 Gültigkeitskriterien.....	19
11 Prüfbericht.....	19

Anhang A (informativ) Robustheit des Verfahrens und Ringversuche zur Bewertung von	
Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren	20
A.1 Zweck	20
A.2 Hintergrund.....	20
A.3 Prüfmaterialien und Methodologie	20
A.4 Datenanalyse.....	21
A.5 Validierungsparameter	24
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung von Enzymaktivitäten im	
Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren	25
B.1 Zweck	25
B.2 Hintergrund.....	25
B.3 Prüfmaterialien und Methodologie	25
B.4 Auswertung der Ergebnisse der Kalibrierkurve.....	26
B.5 Auswertung der Ergebnisse für Enzymaktivitäten im Boden.....	30
Literaturhinweise.....	36

Nationales Vorwort

Das internationale Dokument (ISO/DIS 20130:2017) ist unverändert in diesen Norm-Entwurf übernommen worden.

Das zuständige deutsche 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 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 10381-6	siehe DIN ISO 10381-6

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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*

Vorwort

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

Internationale Normen werden in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet.

Die Hauptaufgabe der Technischen Komitees besteht in der Erarbeitung Internationaler Normen. Die von den Technischen Komitees angenommenen Norm-Entwürfe werden den Mitgliedsorganisationen zur Umfrage zur Verfügung gestellt. Für eine Veröffentlichung als Internationale Norm wird eine Zustimmung von mindestens 75 % der abstimmenden Mitgliedsländer benötigt.

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.

ISO 20130 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *biological methods*, erarbeitet.

Diese zweite/dritte...Fassung ersetzt die erste/zweite...Fassung von (), die technisch überarbeitet wurde.

Einleitung

Mikroorganismen sind für viele Schlüsselprozesse im Kreislauf der Elemente verantwortlich. Dabei sind Enzyme für den Abbau organischer Moleküle und deren Mineralisation verantwortlich. Die wichtigste Grundvoraussetzung ist, dass die Enzyme im Boden mikrobieller Herkunft sind, auch wenn Ausscheidungen von Pflanzenwurzeln Enzyme enthalten. Im Boden spielen extrazelluläre Enzyme eine wichtige Rolle beim biologischen Abbau organischer Makromoleküle. Die gemeinsame Aktivitätsbestimmung verschiedener Enzyme, die für den biologischen Abbau von organischen Verbindungen und die Mineralisation von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel im Boden wichtig sind, zeigt möglicherweise durch Chemikalien und andere anthropogene Einflüsse bedingte schädliche Auswirkungen auf. Allerdings können Enzymaktivitätsbestimmungen unter optimierten Laborbedingungen und unter Verwendung künstlicher Substrate nicht die tatsächlichen enzymatischen Umsatzraten in Böden *in situ* wiedergeben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur gemeinsamen (oder getrennten) Messung verschiedener Hydrolase-Aktivitäten (Arylamidase, Arylsulfatase, β -Galactosidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, N-Acetyl-Glucosaminidase, saure, alkalische und globale Phosphatasen, Urease) in Bodenproben unter Verwendung von kolorimetrischen Substraten fest. Die Enzymaktivitäten im Boden variieren je nach Jahreszeit und sind abhängig von chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des Bodens. Die Anwendung des Verfahrens zum Nachweis der schädlichen Wirkungen toxischer Chemikalien oder anderer anthropogener Einflüsse beruht auf dem gleichzeitigen Vergleich von Enzymaktivitäten in einem dem Prüfboden ähnlichen Kontrollboden oder auf Expositionsuntersuchungen mit Chemikalien oder Behandlungsverfahren.

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*

3 Symbole und Abkürzungen

E.C.:	Enzymklassifikationsnummer nach den Empfehlungen des Nomenklaturkomitees der Internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB)
ARN:	Arylamidase
ARS:	Arylsulfatase
β-GAL:	β -Galactosidase
α-GLU:	α -Glucosidase
β-GLU:	β -Glucosidase
NAG:	N-Acetyl-Glucosaminidase
PHOS:	Phosphatase
PAC:	saure Phosphatase
PAK:	alkalische Phosphatase
URE:	Urease

4 Kurzbeschreibung

In diesem Dokument wird ein Verfahren zur gemeinsamen Aktivitätsbestimmung verschiedener Enzyme in Bodenproben beschrieben (Tabelle 1). Es beruht auf der Verwendung von Lösungen von Bodenproben, die in Wasser mit kolorimetrischen Substraten verdünnt und für einen festgelegten Zeitraum bei $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in Mikrotiterplatten inkubiert werden. Nach der Inkubation werden die Reaktionen gestoppt, die Platten zentrifugiert und die Überstände in neue Platten überführt. Die Enzymaktivitäten werden als Extinktion mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer für Platten mit 96 Vertiefungen und für den UV- und sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen.

Tabelle 1 — Messungen der Enzymaktivität mit kolorimetrischem Verfahren

Enzym	Abkürzung	Nr.	Boden- kreislauf	abgebautes Makromolekül
Arylamidase	ARN	E.C. 3.4.11.2	Stickstoff	
Arylsulfatase	ARS	E.C. 3.1.6.1	Schwefel	Mineralisation von organischem Schwefel
β -Galactosidase	β GAL	E.C. 3.2.1.22	Kohlenstoff	Hemicellulose
α -Glucosidase	α GLU	E.C. 3.2.1.20	Kohlenstoff	Stärke und Glykogen
β -Glucosidase	β GLU	E.C. 3.2.1.21	Kohlenstoff	Cellulose
N-Acetyl- Glucosaminidase	NAG	E.C. 3.2.1.52	Kohlenstoff	Chitin und andere β -1,4-gebundene Glucosamin- Polymere
Phosphatase	PHOS	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
Saure Phosphatase	PAC	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
alkalische Phosphatase	PAK	E.C. 3.1.4.1	Phosphor	Phosphatester
Urease	URE	E.C. 3.5.1.5	Stickstoff	Harnstoff

5 Reagenzien

5.1 Pufferlösungen

5.1.1 Allgemeines

Es wurde die Entscheidung getroffen, deionisiertes Wasser als Medium zu verwenden, um die natürlichen Bodenenzymaktivitäten bei dem pH-Wert des Bodens zu bewerten und auch die Analyse von mehreren Enzymen unter Verwendung derselben Bodensuspension zu ermöglichen. Das Verhältnis von Boden (in g) zu Wasser (in ml) (4 : 25) wurde optimiert, um Reaktion und Empfindlichkeit zu maximieren und um die Pipettiertechnik zu erleichtern. Die Verwendung derselben Bodenlösung für die Analyse mehrerer Enzyme führt außerdem zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Eine Ausnahme muss für Arylamidase gemacht werden, die mit Tris-Pufferlösung, 50 mmol/l, pH-Wert 7,5 gemessen wird, und für Phosphatase, wenn die saure oder alkalische Form zu messen ist. In diesem Fall ist die Verwendung von Tris-Pufferlösung mit einer Konzentration von 50 mmol/l notwendig. Zusammenfassende Informationen zur Verwendung von Pufferlösungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

ANMERKUNG Das Volumen kann bei Bedarf entsprechend angepasst werden.

5.1.2 Trizma-Hydrochlorid, 50 mmol/l, pH-Wert 5,5

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (CAS-Nr.: 1185-53-1 — 157,6 g/mol): 7,88 g;
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 1 000 ml;
- Salzsäure (HCl) (CAS-Nr. 7647-01-0), 1 mol/l.

7,88 g Trizma-HCl sind in 800 ml deionisiertem Wasser zu lösen und mit Salzsäure (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 5,5 einzustellen. Das Volumen ist auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.3 Trizma-Base, 50 mmol/l, pH-Wert 11

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — 121,14 g/mol): 6,06 g;
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 1 000 ml;
- Natriumhydroxid (CAS-Nr. 1310-73-2) (1 mol/l).

6,06 g Trizma-Base werden in 800 ml deionisiertem Wasser zu lösen und mit Natriumhydroxid (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 11 einzustellen. Das Volumen ist auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.4 Trizma-Base, 50 mmol/l, pH-Wert 7,5

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — 121,14 g/mol): 6,06 g;
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 1 000 ml;
- Salzsäure (HCl) (CAS-Nr. 7647-01-0), 1 mol/l.

6,06 g Trizma-Base ist in 800 ml deionisiertem Wasser zu lösen und mit Salzsäure (1 mol/l) auf einen pH-Wert von 7,5 einzustellen. Das Volumen ist auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.5 Trizma-Base, 100 mmol/l, pH-Wert 12

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (CAS-Nr.: 77-86-1 — 121,14 g/mol): 12,12 g;
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 1 000 ml;
- Natriumhydroxid (CAS-Nr. 1310-73-2) (5 mol/l).

12,12 g Trizma-Base ist in 800 ml deionisiertem Wasser zu lösen und mit Natriumhydroxid (5 mol/l) auf einen pH-Wert von 12 einzustellen. Das Volumen ist auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.6 Calciumchlorid-Dihydrat, 0,5 mol/l

- Calciumchlorid-Dihydrat (CAS-Nr.: 10035-04-8 — 147,01 g/mol): 14,7 g;
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 200 ml.

14,7 g Calciumchlorid-Dihydrat ist in 200 ml deionisiertem Wasser zu lösen. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.7 Salicylat-Reagens

- Natriumsalicylat, 270 mM (CAS-Nr.: 54-21-7 — 160,1 g/mol): 865 mg
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 145 mmol/l (CAS-Nr.: 6132-04-3 — 294,1 g/mol): 853 mg
- di-Natriumtartrat-Dihydrat, 60 mmol/l (CAS-Nr.: 6106-24-7 — 230,08 g/mol): 276 mg
- Nitroprussid-Natrium-Dihydrat, 2 mmol/l (CAS-Nr.: 13755-38-9 — 297,95 g/mol): 12 mg
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 20 ml.

Das Salicylat-Reagens wird unmittelbar vor der Analyse aus den vorstehend aufgeführten 4 Verbindungen hergestellt; 865 mg Natriumsalicylat, 853 mg tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 276 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat und 12 mg Nitroprussid-Natrium-Dihydrat sind in 20 ml deionisiertem Wasser zu lösen.

5.1.8 Cyanurat-Reagens

- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 580 mmol/l (CAS-Nr.: 6132-04-3 — 294,1 g/mol): 3,4 g
- di-Natriumtartrat-Dihydrat, 90 mmol/l (CAS-Nr.: 6106-24-7 — 230,08 g/mol): 414 mg
- Lithiumhydroxid, 280 mmol/l (CAS-Nr.: 1310-65-2 — 23,95 g/mol): 134 mg
- Natriumdichlorisocyanurat-Dihydrat 10 mmol/l (CAS-Nr.: 51580-86-0 — 255,98 g/mol): 51 mg
- deionisiertes Wasser, auffüllen auf: 20 ml.

Das Cyanurat-Reagens wird unmittelbar vor der Analyse aus den vorstehend aufgeführten 4 Verbindungen hergestellt; 3,4 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 414 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat, 134 mg Lithiumhydroxid und 51 mg Natriumdichlorisocyanurat-Dihydrat sind in 20 ml deionisiertem Wasser zu lösen.

5.1.9 Ethanol, 96%ig

5.1.10 Angesäuertes Ethanol (0,26 mol/l HCl)

- Salzsäure, ACS-Reinheitsgrad (ACS: American Chemical Society), 37%ig (CAS-Nr. 7647-01-0) 4,32 ml;
- Ethanol, 96%ig (CAS-Nr. 41340-36-7).

4,32 ml konzentrierte HCl werden in 200 ml Ethanol, 96%ig, verdünnt. Die Lagerdauer darf bei $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ einen Monat nicht überschreiten.

5.1.11 p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMCA) (3,5 mmol/l)

- DMCA (CAS-Nr.: 6203-18-5 — 175,23 g/mol): 0,12 g;
- Ethanol, 96%ig (CAS-Nr. 41340-36-7): auffüllen auf 200 ml.

0,12 g DMCA werden in 200 ml Ethanol, 96%ig, gelöst. Die Lagerdauer darf bei $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ eine Woche nicht überschreiten.

Tabelle 2 — Einsatz von Pufferlösungen für die Messung der Enzymaktivität

	ARS, α-GLU, β-GLU, β-GAL, NAG, PHOS	ARN	URE	PAC	PAK
Boden- lösung	deionisiertes Wasser	Trizma-Base, 50 mmol/l, pH 7,5	deionisiertes Wasser	Trizma-HCl, 50 mmol/l, pH 5,5	Trizma-Base, 50 mmol/l, pH 11
Stopp/- Nachweis	Trizma, 100 mmol/l, pH 12, CaCl ₂ , 0,5 mol/l	Ethanol, 96%ig Angesäuertes Ethanol DMCA	Salicylat-Reagens Cyanurat-Reagens	Trizma, 100 mmol/l, pH 12 CaCl ₂ , 0,5 mol/l	

5.2 Substrate und Standards

5.2.1 Herstellung von Standardlösungen

5.2.1.1 Para-Nitrophenol (CAS-Nr.: 100-02-7 — PNP) mit einer Konzentration von 3,6 mmol/l

- para-Nitrophenol (PNP) (139,11 g/mol): 10 mg;
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

PNP in Pulverform sollte bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ und lichtgeschützt aufbewahrt werden. PNP ist sorgfältig einzuwägen und in deionisiertem Wasser zu lösen. Die Lagerdauer der konzentrierten Lösung darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten. Die Arbeitskonzentration beträgt 0,36 mmol/l (Verdünnung der konzentrierten Lösung 1/10). Die Lagerdauer der Arbeitskonzentration darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten.

5.2.1.2 Ammoniumchlorid (NH_4Cl) mit einer Konzentration von 62 mmol/l

- Ammoniumchlorid (CAS-Nr.: 12125-02-9 — 53,49 g/mol): 66,4 mg;
- deionisiertes Wasser: 20 ml.

Ammoniumchlorid in Pulverform kann lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Ammoniumchlorid ist sorgfältig einzuwägen und in Wasser zu lösen. Die konzentrierte Lösung sollte bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ für zwei Jahre aufbewahrt werden. Die Lagerdauer der konzentrierten Lösung darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten. Die Arbeitskonzentration beträgt 0,62 mmol/l (Verdünnung 1/100). Die Lagerdauer der Arbeitskonzentration darf bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ zwei Jahre nicht überschreiten.

5.2.1.3 β -Naphthylamin, 2 mmol/l

- β -Naphthylamin (CAS-Nr.: 91-59-8 — 143,19 g/mol): 28,64 mg;
- Ethanol, 96%ig: 20 ml;
- deionisiertes Wasser.

28,64 mg β -Naphthylamin sind in 20 ml Ethanol, 96%ig, zu lösen. Diese Lösung muss bei -20°C für ein Jahr aufbewahrt werden. Die Arbeitskonzentration beträgt 1 mmol/l (Verdünnung 1/10 in Wasser) und muss bei $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ für ein Jahr aufbewahrt werden.

5.2.2 Herstellung von Substratlösungen

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

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

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

Enzym	Substrat ^a (Lagerungstemperatur)	Mol- masse g/mol	Konzen- tration mol/l	Beispiele für Ansätze	Lagerung von Lösungen (T in °C, Dauer)
Arylamidase	(S)-2-Amino-4-methyl-N-2-naphthylvaleramidmonohydrochlorid (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 893-36-7	292,8	0,008	0,234 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
Arylsulfatase	Kalium-4-nitrophenylsulfat (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 6217-68-1	257,26	0,025	0,322 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
β-Galactosidase	p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 3150-24-1	301,25	0,05	0,753 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
α-Glucosidase	4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranosid (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 3767-28-0	301,25	0,025	0,375 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
β-Glucosidase	4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 2492-87-7	301,25	0,05	0,753 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
N-Acetyl-Glucosaminidase	para-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid (−20 ± 2) °C CAS-Nr.: 3459-18-5	342,31	0,01	0,171 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
Phosphatase saure Phosphatase und alkalische Phosphatase	4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat (+4 ± 2) °C CAS-Nr.: 333338-18-4	371,12	0,05	0,928 g sind in 50 ml deionisiertem Wasser zu lösen	(−20 ± 2) °C 1 Jahr
Urease	Harnstoff > 98 % (RT) CAS-Nr.: 57-13-6	60,06	0,4	0,480 g sind in 20 ml deionisiertem Wasser zu lösen	+4 °C 1 Woche
^a Sigma-Aldrich ist ein Beispiel für einen Hersteller von kolorimetrischen Substraten. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.					

6 Geräte und Materialien

Zusätzlich zur üblichen Laborausrüstung sind folgende Geräte erforderlich:

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

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

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

6.3 Orbitalschüttelgerät.

6.4 Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Polystyren, mit flachem Boden, jedoch ohne Behandlung, mit Deckeln.

6.5 Automatischer Probengeber für Wasser (optional).

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

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

6.7 Brutschränke, eingestellt auf (25 ± 2) °C und (37 ± 2) °C.

6.8 Mikrotiterplattenzentrifuge, mit einer Temperaturregelung bei 20 °C und einer Drehzahl von 1 500 g.

6.9 Mikrotiterplatten-Spektralphotometer, mit Ablesung bei 405 nm, 540 nm und 650 nm (Monochromator oder BP ± 10 nm).

7 Durchführung

7.1 Erstellung von Kalibrierkurven

7.1.1 Allgemeines

Kalibrierkurven erfordern mindestens die Doppel-, vorzugsweise die Dreifachbestimmung mehrerer Konzentrationen von para-Nitrophenol (PNP), Ammoniumchlorid (NH_4Cl) oder β -Naphthylamin. Während der Erstellung der Kalibrierkurven muss die Einwirkung von Licht begrenzt werden. Beispiele für Kalibrierkurven sind in Anhang B angeführt.

7.1.2 PNP-Lösung

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

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

[PNP] nmol/ml	0	14	29	72	140	220	290	360
PNP (μ l)	0	5	10	25	50	75	100	125
Wasser (μ l)	150	145	140	125	100	75	50	25

Um die gelbe Färbung von PNP sichtbar zu machen, werden 25 µl Calciumchlorid und 100 µl basische Trizma-Pufferlösung, pH-Wert 12, hinzugefügt. Nach dem Homogenisieren werden 200 µl in neue Platten überführt und die Messung der Extinktion erfolgt bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer.

7.1.3 β -Naphthylamin-Lösung

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

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

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

Um die Färbung von β -Naphthylamin sichtbar zu machen, werden 100 µl angesäuertes Ethanol und 100 µl p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMCA) hinzugefügt und gemischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation erfolgt die Messung der Extinktion bei 540 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer.

7.1.4 Ammoniumchlorid-Lösung

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

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

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

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von NH₄Cl werden zu jeder Vertiefung 40 µl Salicylat-Reagens hinzugefügt. Nach einer Reaktionsdauer von 3 min werden in jede Vertiefung 40 µl Cyanurat-Reagens gegeben, jeweils gut homogenisiert und anschließend im Dunkeln für 30 min inkubiert (die Extinktion ist für zwei Stunden stabil). Nach der Inkubation werden die Platten zentrifugiert, 200 µl werden in neue Platten überführt und die Messung der Extinktion erfolgt bei 650 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer.

7.2 Probenahme

Bodenproben sind nach den Festlegungen von ISO 10381-6 zu entnehmen und zu behandeln. Bei Mischproben, die vom Feld entnommen, homogenisiert und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 2 mm (bis zu 5 mm je nach Bodenstruktur und -feuchtigkeit) gesiebt wurden, wurde festgestellt, dass sie eine für Bodenproben angemessene geringe Messunsicherheit erreichten.

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

7.2.1 Probenvorbereitung

7.2.1.1 Homogenisieren

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

7.2.1.2 Vorbereitung von Proben-Platten

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

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

ANMERKUNG 2 Bei humushaltigen Böden ist es möglich, größere Spitzen zum Pipettieren zu verwenden.

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

Legende

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

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

7.2.2 Substratzugabe

Eine einfache Organisation liegt vor, wenn eine Platte für ein Enzym verwendet wird. Wenn alle Proben in Platten verteilt sind, werden Mehrkanal-Mikropipetten zum Verteilen der jeweiligen Substrate in dreifacher Ausführung (siehe 7.3.2) und zum Homogenisieren durch zwei oder drei Ansaug-/Entleerungsvorgänge verwendet; anschließend werden die Mikrotiterplatten inkubiert. Nach der Inkubation werden die Reaktionen gestoppt, die Platten 5 min bei 1 500 *g* zentrifugiert und die Überstände in neue Platten überführt. Anschließend wird mit einem Spektralphotometer für Mikrotiterplatten die Extinktion gemessen. In Tabelle 7, Teil B, sind die Protokolle für alle Enzymmessungen zusammengefasst.

Tabelle 7 — Spezifische experimentelle Einzelheiten für Messungen der Enzymaktivität

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

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

ANMERKUNG 1 Die Inkubationstemperatur wirkt sich auf die Reaktionsgeschwindigkeiten aus und das Optimum hängt von den Enzymen ab. In Abhängigkeit von der Untersuchung kann eine andere Temperatur als die in der vorliegenden Internationalen Norm beschriebene Temperatur verwendet werden, z. B. die *in-situ*-Temperatur.

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

7.2.3 Extinktionsmessungen

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

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

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

7.2.3.2 Messungen von Arylamidase-Aktivitäten

Nach der Inkubation werden in alle Vertiefungen 150 µl Ethanol, 96%ig, und 25 µl Substrat-Lösung in die Kontroll-Vertiefungen hinzugefügt. Die Platte wird fünf Minuten bei 1 500 *g* zentrifugiert und 100 µl Überstand werden in eine neue Platte überführt. Zur Bestimmung der Menge an gebildetem Naphthylamin werden 100 µl angesäuertes Ethanol und 100 µl DMCA hinzugefügt und gemischt. Nach 20 min erfolgt die Messung der Extinktion bei 540 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer.

7.2.4 Messungen von Urease-Aktivitäten

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

8 Berechnung der Ergebnisse

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

Beispiele für Kalibrierkurven sind in Anhang B angeführt.

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

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

Dabei ist

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

9 Angabe der Ergebnisse

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

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

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

10 Gültigkeitskriterien

- a) Die Kalibrierkurve ist gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind (entsprechend den im zweiten Anhang zusammengefassten Ergebnissen des Ringversuchs):
- $r^2 \geq 0,990$;
 - die Extinktion für den Bereich der PNP-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,04 \text{ bis } 1,8] \pm 10 \%$;
 - die Extinktion für den Bereich der β -Naphthylamin-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,06 \text{ bis } 2,3] \pm 10 \%$;
 - die Extinktion für den Bereich der Ammonium-Kalibrierkurve liegt innerhalb von $[0,05 \text{ bis } 1,6] \pm 10 \%$.
- b) Bezüglich der Proben:
- der CV in Prozent (% CV) der Dreifachbestimmungen muss $\leq 15 \%$ sein;
 - die Extinktion der Harnstoff-Blindprobe muss $\leq 0,2$ sein;
 - bei den Urease-Messungen muss der Leerwert der Probe ≤ 1 sein;
 - die Differenzen zwischen der Extinktion für Analyse und Leerwert der Probe müssen in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit und Wiederholpräzision des Spektralphotometers $\geq 0,02 \text{ UDO}$ bis $0,05 \text{ UDO}$ sein.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

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

Anhang A (informativ)

Robustheit des Verfahrens und Ringversuche zur Bewertung von Enzymaktivitäten im Boden mit einem kolorimetrischen Verfahren

A.1 Zweck

Die Robustheit des in dieser Internationalen Norm beschriebenen Verfahrens zur Beurteilung der Enzymaktivitäten im Boden in Mikrotiterplatten mit kolorimetrischen Verfahren wird bewertet. Die Bewertung der Robustheit erfolgt mit Vergleichsprüfungen in Bezug auf Spezifität, Empfindlichkeit, Linearität und spezifische Betriebsparameter.

A.2 Hintergrund

Der Ringversuch wird in der Einheit ECOSYS, Plattform BiochemEnv, INRA, Frankreich, durchgeführt.

A.3 Prüfmaterialeien und Methodologie

Die Auswirkung des Siebens wurde an den Aktivitäten von PHOS, GLU, ARS, GAL, NAG, URE und ARN von 4 Böden (1 sandiger Boden, 1 lehmiger Tonboden, 2 Schlufflehm Böden) untersucht.

Auswirkung des pH-Wertes: 2 Böden wurden auf jede Enzymaktivität untersucht und in Wasser oder Tris-Pufferlösung von 50 mmol/l, pH-Wert 5 bis 9 vorbereitet.

Auswirkung der Inkubationsdauer: Für jedes Enzym wurden 4 Inkubationsdauern gewählt, um die Robustheit des Verfahrens nach Tabelle A.1 zu bewerten.

Tabelle A.1 — Bereich der an den Enzymaktivitäten untersuchten Inkubationsdauern

Enzyme	ARN	ARS	β -GAL	α -GLU	β -GLU	NAG	PHOS-PAC-PAK	URE
Inkubationsdauern (min)	30-60-120-180	60-120-180-240	60-120-180-240	30-60-90-120	30-60-90-120	30-60-90-120	15-30-45-60	60-120-180-240

Auswirkung des Bearbeiters: 3 Böden wurden durch vier verschiedene Personen in Bezug auf jedes Enzym untersucht, um die Auswirkung des Bearbeiters zu bewerten.

Die Spezifität für jedes Enzym wird an einem lehmiger Tonboden mit oder ohne Autoklavieren untersucht.

Validierungsparameter: Linearität des Produktnachweises: Die Kalibrierkurven werden mit PNP (0 μ mol/l bis 600 μ mol/l), Ammoniumchlorid (0 μ mol/l bis 600 μ mol/l) und β -Naphthylamin (0 μ mol/l bis 300 μ mol/l) erstellt.

Linearität der Bodenreaktion: Bodenlösungen mit 0,5 g bis 12 g Boden und 25 ml destilliertem Wasser wurden zur Messung von Enzymaktivitäten verwendet.

Bestimmungsgrenzen und Präzision: Streuparameter werden mit einem Genauigkeitsprofil bestimmt, das ISO 17025 und die Schätzung der Messunsicherheit kombiniert. Das Verfahren beruht auf der Verwendung des aus den Leistungskriterien, wie z. B. Richtigkeit und Präzision, abgeleiteten Gesamtfehlers (Hubert u. a. 2004, NF V03-110:2010). Vier Böden (sandiger, lehmiger, Ton- und Humusboden) wurden dreifach mit 3 Wiederholungen (Wiederholpräzision) und 6 Reihen (Präzision unter Zwischenbedingungen) analysiert.

A.4 Datenanalyse

Robustheit des Verfahrens

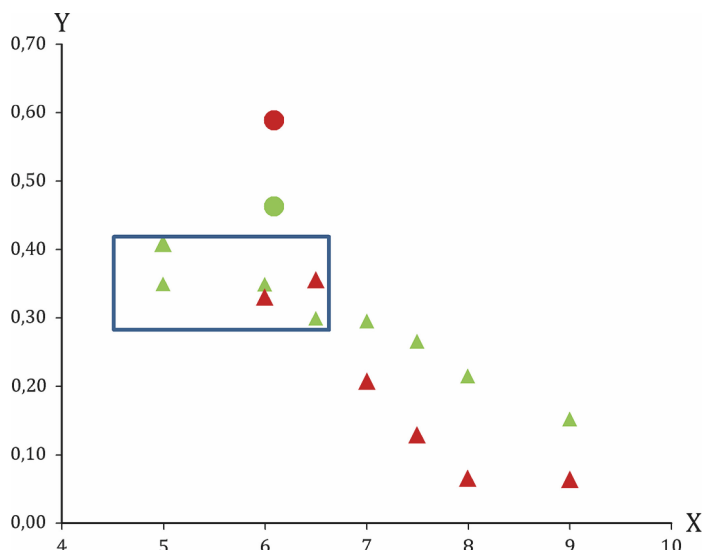
Auswirkung des Bearbeiters: unabhängig vom betrachteten Enzym liegt keine Auswirkung des Bearbeiters vor.

Auswirkung des Siebens: bei allen Enzymen und Böden, außer bei NAG in zwei Böden (einige Beispiele sind in Tabelle A.2 angeführt) wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Tabelle A.2 — Auswirkung des Siebens auf Enzymaktivitäten

Böden	Sieben	Enzymaktivitäten (n = 3, mU/g trockener Boden)				
		PHOS	β -GLU	ARS	β -GAL	NAG
sandiger Boden	5 mm	11,20 $\pm$ 0,53	7,67 $\pm$ 0,50	1,08 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,16
	2 mm	10,47 $\pm$ 1,22	7,36 $\pm$ 0,12	1,22 $\pm$ 0,15	1,13 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,39
lehmiger Tonboden	5 mm	20,09 $\pm$ 0,56	11,14 $\pm$ 0,17	3,52 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,09	1,84 $\pm$ 0,08
	2 mm	21,82 $\pm$ 1,37	11,70 $\pm$ 0,12	3,69 $\pm$ 0,07	1,55 $\pm$ 0,09	1,49 $\pm$ 0,03
Schlufflehm Boden	5 mm	18,87 $\pm$ 0,16	7,38 $\pm$ 0,07	4,47 $\pm$ 0,30	0,95 $\pm$ 0,07	1,31 $\pm$ 0,37
	2 mm	17,34 $\pm$ 0,28	7,61 $\pm$ 1,25	4,63 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,35
Schlufflehm Boden	5 mm	19,10 $\pm$ 1,04	4,86 $\pm$ 0,40	1,45 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,14	1,74 $\pm$ 0,29
	2 mm	18,39 $\pm$ 0,66	4,75 $\pm$ 0,10	1,47 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,09	1,05 $\pm$ 0,22

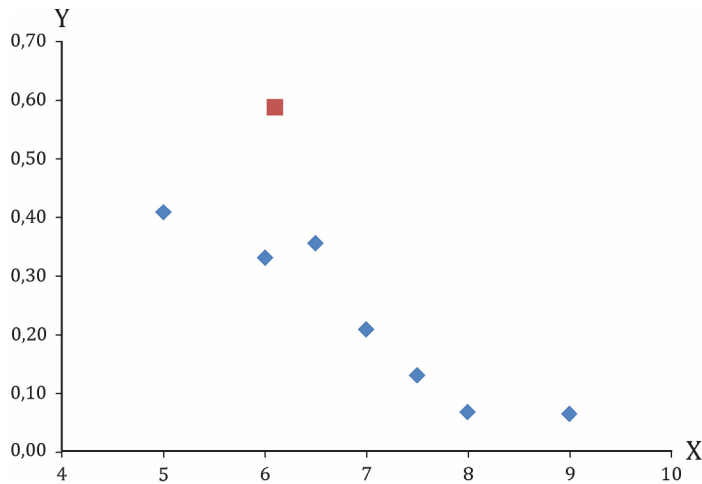
Auswirkung des pH-Wertes: für das PNP-Enzymmodell geben mehrere Autoren eine optimale Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 6 an (Acosta-Martinez und Tabatabai 2000, Turner 2010), und für die Aktivität von Arylamidase und Urease bei einem pH-Wert von etwa 8. Die Ergebnisse zeigten, dass für PNP-Enzyme (β -GLU, α -GLU, β -GAL, PHOS, ARS und NAG) [Bild A.1 a)] optimale Aktivitäten in Tris, 50 mmol/l, pH 5 bis 6,5, jedoch höhere Aktivitäten mit destilliertem Wasser vorlagen. Die Ergebnisse für die Urease-Aktivitäten sind sehr ähnlich [Bild A.1 b)]. Im Gegensatz dazu ist die Arylamidase sehr empfindlich in Bezug auf den pH-Wert der Lösung/des Bodens [Bild A.1 c)] und optimale Bedingungen liegen bei Tris, 50 mmol/l, pH-Wert 7,5 bis 8, vor.



Legende

- | | | | |
|---|---------------------------|---|------------------------------------|
| X | pH-Wert | ▲ | schluffiger Boden mit Pufferlösung |
| Y | Enzymaktivität (mU/g) | ● | Tonboden in Wasser |
| ▲ | Tonboden mit Pufferlösung | ● | schluffiger Boden in Wasser |

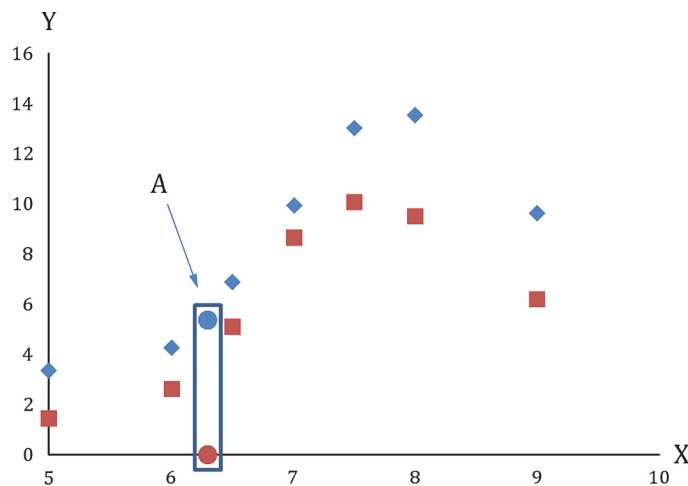
a) Auswirkung von Pufferlösung auf die Aktivität von GLU, GAL und NAG



Legende

- X pH-Wert
- Y Enzymaktivität (mU/g)
- ◆ Tris-Pufferlösung, 50 mmol/l
- Wasser

b) Auswirkung des pH-Wertes auf die Urease-Aktivität



Legende

- X pH-Wert
- Y Enzymaktivität (mU/g)
- A Aktivität in Wasser
- ◆ Schlufflehm Boden
- lehmiger Tonboden

c) Auswirkung des pH-Wertes auf die Arylamidase-Aktivität

Bild A.1 — Auswirkung des pH-Wertes auf Enzymaktivitäten

Auswirkung der Inkubationsdauer: die Ergebnisse zeigten, dass mehrere Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer sehr robust sind, hauptsächlich bei der PNP-Messung [Bild A.2 a)], solange sie im linearen Bereich der quantitativen Bestimmung von PNP bleiben. Bei Urease [Bild A.2 b)] ergeben kurze Inkubationsdauern keine guten Aktivitäten und bei Arylamidase (Daten nicht dargestellt) rufen lange Inkubationsdauern eine Sättigung der Reaktion hervor. In Tabelle A.3 sind offene Bereiche für Inkubationen dargestellt (fett gedruckte Daten sind die gewählten Inkubationsdauern in der ISO-Norm).