

DIN EN ISO 11268-2



ICS 13.080.30

Ersatz für
DIN EN ISO 11268-2:2015-11

**Bodenbeschaffenheit –
Wirkungen von Verunreinigungen auf Regenwürmer –
Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von
Eisenia fetida/*Eisenia andrei* und andere Regenwurmarten
(ISO 11268-2:2023);
Deutsche Fassung EN ISO 11268-2:2023**

Soil quality –

Effects of pollutants on earthworms –

Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* and other earthworm species (ISO 11268-2:2023);

German version EN ISO 11268-2:2023

Qualité du sol –

Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre –

Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* et d'autres espèces de vers de terre (ISO 11268-2:2023);

Version allemande EN ISO 11268-2:2023

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11268-2:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im Arbeitsausschuss NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung (Koordinierung ISO/TC 190; ISO/TC 275, CEN/TC 308, CEN/TC 444, CEN/SABE/ENV)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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

ISO 10390	siehe	DIN EN ISO 10390
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11268-1	siehe	DIN EN ISO 11268-1
ISO 15799:2019	siehe	DIN EN ISO 15799:2023-08
ISO 17616:2019	siehe	DIN EN ISO 17616:2023-08
ISO 18400-206	siehe	DIN ISO 18400-206
ISO 21286	siehe	DIN EN ISO 21286

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 11268-2:2015-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Konzentration für die Referenzsubstanz (Borsäure);
- b) Aufnahme alternativer Arten von Regenwürmern – *Dendrodrilus rubidus*, *Aporrectodea caliginosa* – in informative Anhänge;
- c) Informationen über ihre Taxonomie und Ökologie sowie über ihre spezifischen Prüfanforderungen wurden hinzugefügt;
- d) Erweiterung des Titels um „und andere Regenwurmartens“.

Frühere Ausgaben

DIN ISO 11268-2: 2000-03
DIN EN ISO 11268-2: 2015-11

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10390, *Boden, behandelter Bioabfall und Schlamm — Bestimmung des pH-Werts*

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

DIN EN ISO 11268-1, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität auf Eisenia fetida/Eisenia andrei*

DIN EN ISO 15799:2023-08, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien (ISO 15799:2019); Deutsche Fassung EN ISO 15799:2022*

DIN EN ISO 17616:2023-08, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung für die Auswahl und Beurteilung von Biotestverfahren zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien (ISO 17616:2019); Deutsche Fassung EN ISO 17616:2022*

DIN EN ISO 21286, *Bodenbeschaffenheit — Identifizierung der Testorganismenarten für ökotoxikologische Tests mit Hilfe von DNA-Barcoding*

DIN ISO 18400-206, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 206: Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Beurteilung von biologischen funktionalen und strukturellen Endpunkten im Labor*

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit —
Wirkungen von Verunreinigungen auf Regenwürmer —
Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die
Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* und
andere Regenwurmart (ISO 11268-2:2023)

Soil quality —
Effects of pollutants on earthworms —
Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia*
fetida/*Eisenia andrei* and other earthworm species
(ISO 11268-2:2023)

Qualité du sol —
Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre —
Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction
de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* et d'autres espèces de
vers de terre (ISO 11268-2:2023)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. Januar 2023 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien und Material	10
6 Geräte	12
7 Durchführung	13
7.1 Prüfaufbau	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 Vorprüfung	13
7.1.3 Hauptprüfung	13
7.2 Herstellung der Prüfmischungen	14
7.2.1 Prüfung des verunreinigten Bodens	14
7.2.2 Prüfung der dem Kontrollboden zugegebenen Substanzen	15
7.2.3 Vorbereitung der Kontrollbehälter	15
7.3 Zugabe der Regenwürmer	16
7.4 Prüfbedingungen und Messungen	16
7.5 Referenzsubstanz	16
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	17
8.1 Berechnung	17
8.2 Angabe der Ergebnisse	17
9 Gültigkeit der Ergebnisse	17
10 Statistische Analyse	17
10.1 Allgemeines	17
10.2 Einzel-Konzentrationsprüfungen	18
10.3 Mehrfach-Konzentrationsprüfungen	18
10.3.1 Vorprüfung	18
10.3.2 Hauptprüfung	18
11 Prüfbericht	19
Anhang A (informativ) Bestimmung der chronischen Toxizität von Chemikalien auf <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i> unter tropischen Bedingungen	21
A.1 Allgemeines	21
A.2 Änderungen des Abschnitts 5, Abschnitts 6 und des Anhangs D	21
A.2.1 In Bezug auf Abschnitt 5	21
A.2.2 In Bezug auf 6.6	22
A.2.3 In Bezug auf Anhang D	22
Anhang B (informativ) Kultivierungs- und Prüfverfahren zur Bewertung der Auswirkungen von Verunreinigungen auf die Jungtierproduktion am Beispiel des Regenwurms <i>Dendrodrilus rubidus</i>	23
B.1 Allgemeines	23
B.2 Geografische Verbreitung und Ökologie	23
B.3 Kultivierung von <i>Dendrodrilus rubidus</i>	23
B.4 Durchführung	24
B.4.1 Allgemeines	24
B.4.2 Biologisches Material	24
B.4.3 Prüfbehälter	25
B.4.4 Testumgebung (Bedingungen)	25
B.4.5 Anforderung an die Replikate	25

B.4.6	Anforderung an den Boden	25
B.4.7	Zugabe der Prüforganismen in die Prüfgefäße	25
B.4.8	Fütterung und Bodenfeuchte	25
B.4.9	Betreuung der Prüfung und Messungen	26
B.4.10	Gültigkeit der Prüfung	26
B.4.11	Ergebnisse und Berichterstattung	26
Anhang C (informativ) Kultur- und Prüfverfahren zur Bewertung der Auswirkungen von Verunreinigungen auf das Überleben der adulten Tiere, die Kokonproduktion und die Schlupfrate am Beispiel des Regenwurms <i>Aporrectodea caliginosa</i> s.s.		27
C.1	Allgemeines	27
C.2	Geografische Verbreitung und Ökologie von <i>A. caliginosa</i> s.s.	27
C.3	Taxonomie und morphologische Beschreibung	28
C.4	Kultivierung von <i>Aporrectodea caliginosa</i> s.s.	28
C.5	Verfahren	29
C.5.1	Biologisches Material	29
C.5.2	Prüfsubstrat und Behälter	29
C.5.3	Prüfumgebung (Bedingungen)	30
C.5.4	Zugabe der Regenwürmer	30
C.5.5	Messungen	30
C.5.6	Gültigkeit der Prüfung	30
Anhang D (informativ) Anzucht von <i>Eisenia fetida</i> und <i>Eisenia andrei</i>		31
Anhang E (normativ) Bestimmung der Wasserhaltekapazität		32
E.1	Allgemeines	32
E.2	Geräte	32
E.3	Durchführung	32
E.4	Berechnung der Wasserhaltekapazität (C_{WH})	32
Anhang F (informativ) Auszähltechniken für die aus den Kokons geschlüpften juvenilen Würmer		33
Anhang G (informativ) Erfahrung mit den Leistungskriterien des Prüfverfahrens		34
G.1	Allgemeines	34
G.2	Kriterien für die Gültigkeit des Verfahrens	34
G.3	Empfindlichkeit des Prüfsystems	34
G.4	Ergebnisse von Prüfungen mit Borsäure als Referenzsubstanz	35
Literaturhinweise		42

Bilder

Bild C.1 — Nasssiebverfahren zur Kokongewinnung (1 mm Maschenweite)	30
---	----

Tabellen

Tabelle C.1 — Leitlinien für eine nachhaltige und optimierte Kultur von <i>A. caliginosa</i> s.s.	28
Tabelle G.1 — Kriterien für die Gültigkeit des Verfahrens und Prozentsatz der Untersuchungen, die diese Kriterien erfüllen	34
Tabelle G.2 — Empfindlichkeit des Prüfsystems, beruhend auf 45 Ergebnissen von 19 die Gültigkeitskriterien erfüllenden Prüfungen	34
Tabelle G.3 — Beispiel für eine Reproduktionsprüfung an Regenwürmern mit Borsäure als Referenzsubstanz	35
Tabelle G.4 — Zusammenstellung der in verschiedenen Laboratorien erzielten Ergebnisse zu Borsäure	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11268-2:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 11268-2:2015.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11268-2:2023 wurde von CEN als EN ISO 11268-2:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological characterization*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 444, *Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese dritte Ausgabe ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 11268-2:2012), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

- Änderung der Konzentration der Referenzsubstanz (Borsäure);
- Aufnahme alternativer Regenwurmartens – *Dendrodrilus rubidus*, *Aporrectodea caliginosa* – in informative Anhänge; außerdem wurden Informationen über die Taxonomie und Ökologie dieser Arten sowie deren spezifische Anforderungen bei der Prüfung aufgenommen.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 11268 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Ökotoxikologische Prüfsysteme werden angewendet, um Informationen über die Wirkungen von Verunreinigungen im Boden zu erhalten, und sie sind zur Ergänzung der herkömmlichen chemischen Analysen (siehe ISO 15799 und ISO 17616) vorgesehen. ISO 15799 enthält eine Aufstellung und eine kurze Charakterisierung der empfohlenen und genormten Prüfsysteme und ISO 17616 gibt eine Anleitung zur Auswahl und Bewertung von Biotests. Aquatische Prüfsysteme mit Bodeneluat werden angewendet, um Informationen über den Anteil der Verunreinigungen zu erhalten, die möglicherweise über den Wasserweg (Rückhaltefunktion von Böden) das Grundwasser erreichen, wogegen terrestrische Prüfsysteme zur Bewertung der Lebensraumfunktion der Böden angewendet werden.

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren, mit dem die subletale Toxizität von verunreinigten Böden auf adulte Regenwürmer der Arten *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) und *Eisenia andrei* (André, 1963) bestimmt wird. Optional kann das Verfahren zur Bewertung von Chemikalien, die einem Standardboden (z. B. künstlichen Boden) zugefügt wurden, in Hinsicht auf deren subletales toxisches Potential gegenüber Regenwürmern angewendet werden. Schließlich werden Informationen gegeben, wie dieses Verfahren zur Bewertung von Chemikalien oder zu prüfenden Boden unter tropischen Bedingungen (siehe Anhang A) anzuwenden ist.

Eisenia fetida und *Eisenia andrei* gelten als Vertreter der Bodenfauna und speziell der Regenwürmer in gemäßigten Regionen. Hintergrundinformationen über die Ökologie der Regenwürmer und ihre Verwendung bei ökotoxikologischen Untersuchungen sind verfügbar. Diese Arten kommen jedoch nicht regelmäßig auf landwirtschaftlichen Flächen (Acker- und Grünland) oder in Wäldern in diesen Regionen vor. Darüber hinaus sind sie nicht repräsentativ für boreale oder tropische Regionen. Daher wurden andere Arten wie *Dendrodrilus rubidus* (ein epigäischer Streubewohner in borealen Regionen) und *Aporrectodea caliginosa* (ein endogäischer Mineralienbewohner in gemäßigten Regionen) als mögliche alternative Testarten hinzugefügt (siehe Anhang B und Anhang C). Diese alternativen Regenwurmart werden schon seit einiger Zeit als ökotoxikologische Testarten verwendet, allerdings ist die Testerfahrung auf bestimmte Länder beschränkt.

Dieses Dokument wurde unter Berücksichtigung der von der Organisation für wirtschaftliche Entwicklung und Zusammenarbeit [45] [46] und der Europäischen Union [29] herausgegebenen Prüfverfahren erstellt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden und zur Bestimmung der Effekte von Bodenverunreinigungen und Chemikalien auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* bei Aufnahme über die Haut und durch das Futter fest. Dieses chronische Verfahren ist anwendbar auf Böden und Bodenmaterialien von unbekannter Qualität, die z. B. von verunreinigten, landwirtschaftlich beeinflussten oder anderen betroffenen Standorten stammen, oder bei denen es sich um veränderte Böden, Böden nach der Sanierung, oder um Abfallmaterialien handelt.

Dieses Verfahren ist hauptsächlich für die Bestimmung der Auswirkungen von Bodenverunreinigungen und Chemikalien auf die Reproduktion von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* bestimmt. Außerdem werden technische Informationen darüber gegeben, wie *Eisenia fetida*/*andrei* für die Prüfung von Chemikalien unter tropischen Bedingungen eingesetzt werden können (siehe Anhang A). Schließlich enthält dieses Verfahren auch technische Informationen darüber, wie sie mit anderen umweltrelevanten Regenwurmarten verwendet werden kann: z. B. *Dendrodrilus rubidus* und *Aporrectodea caliginosa* (siehe Anhang B und Anhang C).

Dieses Verfahren ist nicht anwendbar für Stoffe, deren Verteilungskoeffizient Luft/Boden größer als 1 ist, oder für Stoffe mit einem Dampfdruck von mehr als 300 Pa bei 25 °C. Dieses Verfahren berücksichtigt nicht den möglichen Abbau der Substanz während der Prüfung.

WARNUNG — Verunreinigte Böden können unbekannte Gemische von toxischen, mutagenen oder auf andere Art schädlichen Chemikalien oder infektiösen Mikroorganismen enthalten. Berufsbedingte Gesundheitsrisiken können durch Staub oder flüchtige Chemikalien während der Handhabung und Inkubation der verunreinigten Böden auftreten. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um den Hautkontakt mit ihnen zu vermeiden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10390, *Soil, treated biowaste and sludge — 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 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*

ISO 18400-206, *Soil quality — Sampling — Part 206: Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

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

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Verunreinigung

Substanz oder Wirkstoff, die bzw. der im Boden als ein Ergebnis menschlicher Tätigkeit vorhanden ist

[QUELLE: ISO 15176:2019, 3.2.6]

3.2

Wachstum

Zunahme der Biomasse (d. h. der Feuchtmasse der Organismen)

Anmerkung 1 zum Begriff: Es wird in Prozent der Feuchtmasse der Organismen bei Prüfbeginn angegeben.

3.3

Reproduktion

Reproduktionsleistung

durchschnittliche Anzahl der Nachkommen je Prüfbehälter nach acht Wochen Inkubation unter den festgelegten Prüfbedingungen

3.4

ER_x

EC_x

Wirkungsrate

Wirkungskonzentration

x % Wirkungsrate oder -konzentration einer Probe oder einer Prüfsubstanz, bei der die *Reproduktion* (3.3) um x % reduziert ist im Vergleich zur Kontrolle

3.5

Grenzwertprüfung

Prüfung, die aus einem Kontrollboden sowie einer in den *Kontrollboden* (3.10) eingemischten höchsten Konzentration einer Prüfsubstanz bzw. der unverdünnten Probe besteht, wobei jeweils mindestens vier Replikate je Prüfglied verwendet werden

3.6

LOER, en: lowest observed effect rate

LOEC, en: lowest observed effect concentration

geringste Rate, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

niedrigste Rate einer Probe in einem *Kontrollboden* (3.10) oder Konzentration einer Substanz, bei der eine statistisch signifikante Wirkung beobachtet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung wird die LOEC als Prozentwert der Trockenmasse des zu prüfenden Bodens je Trockenmasse der Prüfmischung angegeben. Alle *Prüfmischungen* (3.11) über der LOEC haben eine nachteilige Wirkung, die gleich oder größer ist als die, die bei der LOEC vorliegt. Wenn diese Bedingung nicht erfüllt werden kann, sollte eine Erklärung gegeben werden, wie die LOEC und *NOEC* (3.7) bestimmt wurden.

3.7

NOER, en: no observed effective rate

NOEC, en: no observed effect concentration

höchste Rate ohne statistisch signifikante Wirkung

höchste Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung

geringste Rate eines zu prüfenden Bodens, die gleich unterhalb der LOER/LOEC liegt, oder höchste Konzentration einer Prüfsubstanz, die keine statistisch signifikante letale oder andere Wirkung, wie verminderte *Reproduktion* (3.3) oder Masseänderung (Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle zeigt

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung wird die NOEC als Prozentwert der Trockenmasse des zu prüfenden Bodens je Trockenmasse der Prüfmischung angegeben.

3.8

Referenzboden

nicht verunreinigter standortspezifischer Boden (z. B. in der Nähe eines verunreinigten Standortes entnommen), der ähnliche Eigenschaften aufweist wie der zu prüfende Boden (Nährstoffkonzentrationen, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff und Textur)

3.9

Standardboden

Freilandboden oder künstlicher Boden (Kunsterde), dessen wesentliche Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Textur, Gehalt an organischer Substanz) innerhalb eines bekannten Bereichs liegen

BEISPIEL Eurosoils [29], Kunsterde [46], LUFA Standardboden [40].

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Eigenschaften des Standardbodens können von denen des zu prüfenden Bodens abweichen.

3.10

Kontrollboden

Referenz- (3.8) oder *Standardboden* (3.9), der als Kontrolle und als Medium für die Herstellung der Verdünnungsreihen mit Probe(n) oder einer Referenzsubstanz verwendet wird, der die Validitätskriterien erfüllt

Anmerkung 1 zum Begriff: Bevor ein natürlicher Boden für die Hauptprüfung verwendet wird, ist es ratsam nachzuweisen, dass dieser für eine Prüfung geeignet ist, d. h., dass die prüfungsspezifisch festgelegten Validitätskriterien erfüllt sind.

3.11

Prüfmischung

Mischung von verunreinigtem Boden oder der Prüfsubstanz mit dem *Kontrollboden* (3.10)

Anmerkung 1 zum Begriff: Prüfmischungen werden als Prozentwert des verunreinigten Bodens auf Grundlage der Trockenmasse des Bodens angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Die Wirkungen auf die Reproduktionsleistung von adulten Regenwürmern (Arten: *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei*), die dem zu prüfenden Boden ausgesetzt sind, wird verglichen mit derjenigen Reproduktion, die bei denjenigen adulten Regenwürmern beobachtet wurden, die einem Kontrollboden ausgesetzt waren. Wenn angebracht, werden Wirkungen auf die Regenwürmer, die einer Verdünnungsreihe mit verunreinigtem Boden oder verschiedenen Konzentrationsbereichen einer Prüfsubstanz ausgesetzt wurden, bestimmt. Zusätzlich werden Beobachtungen zum Wachstum und Überleben von adulten Regenwürmern aufgezeichnet. Die Prüfmischungen werden zu Prüfbeginn hergestellt und innerhalb des Prüfzeitraumes nicht erneuert.

Nach vier Wochen werden die adulten Würmer aus den Prüfbehältern entfernt und die Wirkungen auf die Mortalität und die Biomasse durch Zählung und Wägung bestimmt. Nach weiteren vier Wochen wird als letzter Endpunkt die Wirkung auf die Reproduktionsleistung durch Auszählen der Anzahl der aus den Kokons

geschlüpften Nachkommen bestimmt. Die aus den Prüfungen erhaltenen Ergebnisse werden mit denen aus einem Kontrollboden verglichen, oder falls anwendbar, für die Bestimmung der Verdünnungen oder Konzentrationen, die keine Wirkungen auf die Biomasse, Mortalität und Reproduktionsleistung (NOER/NOEC) hervorrufen, bzw. für die Verdünnung (Konzentration) verwendet, die x % Reduzierung der aus den Kokons geschlüpften juvenilen Tiere verglichen mit der Kontrolle (ER_x/EC_x , 56 d) ergibt.

Bei der Prüfung einer Verdünnungs- oder Konzentrationsreihe müssen alle Prüfverdünnungen/-konzentrationen oberhalb der LOER/LOEC eine schädigende Wirkung aufweisen, die gleich oder größer als die bei der LOER/LOEC beobachteten Wirkung ist. Besteht keine Vorkenntnis über die voraussichtlich wirksame Verdünnung/Konzentration des zu prüfenden Bodens/der Prüfsubstanz, dann wird empfohlen, die Prüfung in zwei Schritten durchzuführen:

- eine Vorprüfung durchgeführt nach ISO 11268-1, um eine Angabe zur wirksamen Verdünnung/Konzentration und der Verdünnung/Konzentration, die keine Mortalität (NOER/NOEC) ergibt, zu erhalten; anschließend können die für die in der Hauptprüfung zu verwendenden Verdünnungen/Konzentrationen gewählt werden;
- eine Hauptprüfung zur Bestimmung der subletalen Wirkungen (der Verdünnungen) des verunreinigten Bodens oder der Konzentration einer Chemikalie, die nach gleichmäßigem Einmischen in den Standardboden zu keinen signifikanten Wirkungen auf die Anzahl der aus den Kokons geschlüpften Nachkommen im Vergleich zur Kontrolle (NOER/NOEC) führt, sowie der niedrigsten wirksamen Konzentration (LOER/LOEC).

ANMERKUNG Bei Prüfung verunreinigter Böden wird ein Referenzboden verwendet, um den geeigneten Status der Prüforganismen nachzuweisen und eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden.

Die Wirkungen von Substanzen werden in einem Standardboden, vorzugsweise in einer definierten Kunsterde bewertet. Bei verunreinigten Böden werden die Wirkungen auf das Überleben im zu prüfenden Boden und in einem Kontrollboden bestimmt. Entsprechend der Zielsetzung der Studie sollten die Kontrolle und das für die Herstellung der Verdünnungsreihen des verunreinigten Bodens verwendete Substrat entweder ein mit dem Prüfsubstrat vergleichbarer, nicht verunreinigter Boden (Referenzboden) oder ein Standardboden (z. B. Kunsterde) sein.

Alternative Regenwurmart und ihre jeweiligen Anforderungen werden als spezifische Anhänge in dieses Dokument aufgenommen:

- *Dendrodrilus rubidus* (siehe Anhang B);
- *Aporrectodea caliginosa* (siehe Anhang C).

5 Reagenzien und Material

5.1 Biologisches Material, bestehend aus adulten, zwischen drei Monaten und einem Jahr alten Regenwürmern der Arten *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei* [32] [36] [37] mit einem Clitellum und einer Feuchtmasse zwischen 300 mg und 600 mg (*E. fetida*) bzw. zwischen 250 mg und 600 mg (*E. andrei*). Es wird empfohlen, die Identität des verwendeten Stammes zu überprüfen, um eine falsche Identifizierung der Arten zu vermeiden. Das in ISO 21286 beschriebene DNA-Barcoding ist für diesen Zweck geeignet.

ANMERKUNG 1 Bei dem zur Validierung der ISO 21286 durchgeführten Ringtest gaben nur 17 der 28 beteiligten Labore (61 %) eine korrekte Identifizierung ihrer Laborkultur von Kompostwürmern an. Die meisten Labore mit falschen oder unbekannten Zuordnungen hatten *E. andrei* in Kultur oder eine Mischung aus beiden Arten [57].

Für die Prüfung sind Würmer auszuwählen, die, soweit möglich, hinsichtlich des Alters, der Größe und Masse eine homogene Population bilden. Die Würmer sollten möglichst aus einer zeitlich abgestimmten Kultur mit einer relativ homogenen Altersstruktur ausgewählt werden. Vor der Prüfung sind sie mit Trinkwasser zu waschen.

ANMERKUNG 2 Ein Beispiel eines Anzuchtverfahrens für *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* ist in Anhang D enthalten.

Zur Eingewöhnung sind die ausgewählten Würmer vor ihrer Verwendung einen Tag bis sieben Tage in den Standard- oder Kontrollboden zu setzen. Das Futter, das auch während der Prüfung als Futterquelle (siehe 5.4) genutzt wird, muss in einer ausreichenden Menge (siehe 7.4) zugegeben werden.

5.2 Das Prüfsubstrat darf aus dem im Freiland entnommenen Boden oder aus dem mit der Prüfmischung ergänzten Kontrollboden bestehen.

Die Probe(n) kann (können) unter Freilandbedingungen von einem industriellen, landwirtschaftlichen oder einem anderen Standort mit Prüfanlass entnommen werden oder aus Abfallmaterialien (z. B. Baggergut, kommunaler Schlamm aus einer Kläranlage, Kompostmaterial oder Stalldung) bestehen, die für eine mögliche Landverkipfung in Betracht kommen.

Die Probe(n) ist (sind) durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 4 mm zu geben und gründlich zu durchmischen. Falls notwendig, darf der Boden vor dem Sieben ohne Erwärmung luftgetrocknet werden. Die Lagerung der Probe(n) sollte so kurz wie möglich sein. Der Boden muss nach ISO 18400-206 in Behältern gelagert werden, die die Verluste der Bodenverunreinigungen durch Verflüchtigung und Sorption an den Behälterwänden gering halten. Der pH-Wert des Bodens sollte nicht geändert werden, da dies die Bioverfügbarkeit der Bodenverunreinigungen beeinflussen kann.

Für die Auswertung der Prüfergebnisse müssen die folgenden Eigenschaften für jedes von einem Freiland entnommene Prüfsubstrat bestimmt werden:

- pH-Wert nach ISO 10390;
- Textur (Sand, Lehm, Schluff) nach ISO 11277;
- Wassergehalt nach ISO 11465;
- Wasserhaltekapazität nach Anhang E;
- Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260;
- organischer Kohlenstoff nach ISO 10694.

Die Wasserhaltekapazität aller bei der Prüfung verwendeten Mischungen sollte ebenfalls gemessen werden.

5.3 Kontrollboden, entweder a) Referenzboden oder b) Standardboden, der für die Haltung von Regenwürmern geeignet ist.

- a) Sind Referenzböden von nicht verunreinigten Flächen in der Nähe eines verunreinigten Standortes verfügbar, sollten sie wie der zu prüfende Boden behandelt und gekennzeichnet werden. Wenn eine toxische Verunreinigung oder ungewöhnliche Bodeneigenschaften nicht ausgeschlossen werden können, sollten Standardkontrollböden bevorzugt werden.
- b) Für die Prüfung der Wirkungen von Substanzen, die in den Boden eingemischt werden, oder zur Herstellung der Verdünnungen der Probe(n) sind Standardböden für die Herstellung des Prüfsubstrats zu verwenden. Die Eigenschaften eines im Freiland entnommenen Standardbodens müssen aufgezeichnet werden.

Das als „künstlicher Boden“ (Kunsterde) bezeichnete Substrat kann als ein Standardboden verwendet werden und hat die folgende Zusammensetzung:

- Fein gemahlener Sphagnum-Torf ohne sichtbare Pflanzenreste
- Massenanteile in %
bezogen auf
Trockenmasse
10 %