

## DIN ISO 16387



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –  
Wirkung von Schadstoffen auf *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) –  
Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung und das  
Überleben (ISO 16387:2004)**

Soil quality –  
Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) –  
Determination of effects on reproduction and survival (ISO 16387:2004)

Qualité du sol –  
Effets des polluants sur les *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) –  
Détermination des effets sur la reproduction et la survie (ISO 16387:2004)

Gesamtumfang 33 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Die Internationale Norm ISO 16387:2004 „Soil quality — Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) — Determination of effects on reproduction and survival“ ist unverändert in diese Deutsche Norm übernommen worden.

## Nationales Vorwort

Diese Norm wurde vom ISO/TC 190 „Bodenbeschaffenheit“ erarbeitet. Für Deutschland war der Arbeitsausschuss I 2 „Boden- und Abfalluntersuchungen“ an der Bearbeitung beteiligt.

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

|             |                       |
|-------------|-----------------------|
| ISO 10390   | siehe DIN ISO 10390   |
| ISO 10694   | siehe DIN ISO 10694   |
| ISO 11260   | siehe DIN ISO 11260   |
| ISO 11268-2 | siehe DIN ISO 11268-2 |
| ISO 11272   | siehe DIN ISO 11272   |
| ISO 11277   | siehe DIN ISO 11277   |
| ISO 11465   | siehe DIN ISO 11465   |
| ISO 14240-1 | siehe DIN ISO 14240-1 |
| ISO 15799   | siehe DIN ISO 15799   |

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN ISO 10390, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Werts* (ISO 10390:1994).

DIN ISO 10694, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse)* (ISO 10694:1995).

DIN ISO 11260, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der effektiven Kationenaustauschkapazität und der Basensättigung unter Verwendung von Bariumchloridlösung* (ISO 11260:1994 und ISO 11260 Internationale Änderung 1:1996).

DIN ISO 11268-2, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida) — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung* (ISO 11268-2:1998).

DIN ISO 11272, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Trockenrohdichte* (ISO 11272:1998).

DIN ISO 11277, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren mittels Siebung und Sedimentation* (ISO 11277:1998 + ISO 11277:1998/Cor. 1:2002).

DIN ISO 11465, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse — Gravimetrisches Verfahren* (ISO 11465:1993).

DIN ISO 14240-1, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 1: Substrat-induziertes Respirationsverfahren* (ISO 14240-1:1997).

DIN ISO 15799, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien* (ISO 15799:2003).

## Deutsche Übersetzung

**Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf *Enchytraeidae*  
(*Enchytraeus* sp.) — Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung  
und das Überleben**

**Inhalt**

|                                                                                                                      | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Vorwort .....                                                                                                        | 5     |
| Einleitung.....                                                                                                      | 6     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                                                            | 6     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                                                                       | 6     |
| 3 Begriffe .....                                                                                                     | 7     |
| 4 Kurzbeschreibung .....                                                                                             | 8     |
| 5 Materialien .....                                                                                                  | 8     |
| 6 Geräte.....                                                                                                        | 10    |
| 7 Prüfbedingungen .....                                                                                              | 11    |
| 8 Durchführung .....                                                                                                 | 11    |
| 8.1 Einmischung des Prüfsubstrats .....                                                                              | 11    |
| 8.2 Vorbereitung des Inhalts der Prüfgefäße .....                                                                    | 12    |
| 8.3 Vorprüfung .....                                                                                                 | 12    |
| 8.4 Hauptprüfung .....                                                                                               | 12    |
| 8.5 Referenzsubstanz .....                                                                                           | 13    |
| 8.6 Zusammenfassung des zeitlichen Ablaufs der Prüfung .....                                                         | 13    |
| 9 Berechnung und Angabe der Ergebnisse .....                                                                         | 14    |
| 9.1 Allgemeines.....                                                                                                 | 14    |
| 9.2 Vorprüfung .....                                                                                                 | 14    |
| 9.3 Hauptprüfung .....                                                                                               | 15    |
| 10 Gültigkeit des Verfahrens .....                                                                                   | 15    |
| 11 Prüfbericht.....                                                                                                  | 16    |
| Anhang A (normativ) Detaillierte Beschreibung der Extraktionstechnik .....                                           | 17    |
| Anhang B (normativ) Bestimmung der Wirkungen belasteter Böden auf die Reproduktion<br>von <i>Enchytraeidae</i> ..... | 19    |
| Anhang C (informativ) Bestimmung des pH-Werts.....                                                                   | 24    |
| Anhang D (informativ) Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität.....                                             | 25    |
| Anhang E (informativ) Zuchtbedingungen für <i>Enchytraeus</i> sp.....                                                | 26    |
| Anhang F (informativ) Durchführung der Prüfung mit anderen <i>Enchytraeus</i> -Spezies.....                          | 28    |
| Anhang G (informativ) Überblick über die statistische Auswertung der Daten<br>(NOEC-Bestimmung) .....                | 30    |
| Literaturhinweise .....                                                                                              | 31    |

## Vorwort

Die ISO (Internationale Organisation für Normung) ist die weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedskörperschaften). Die Erarbeitung Internationaler Normen obliegt den Technischen Komitees der ISO. Jede Mitgliedskörperschaft, die sich für ein Thema interessiert, für das ein Technisches Komitee eingesetzt wurde, ist berechtigt, in diesem Komitee mitzuarbeiten. Internationale (staatliche und nichtstaatliche) Organisationen, die mit der ISO in Verbindung stehen, sind an den Arbeiten ebenfalls beteiligt. Die ISO arbeitet bei allen Angelegenheiten der elektrotechnischen Normung eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

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

Die Hauptaufgabe von Technischen Komitees ist das Erarbeiten von Internationalen Normen. Die von den Technischen Komitees verabschiedeten internationalen Norm-Entwürfe werden den Mitgliedskörperschaften zur Abstimmung vorgelegt. Die Veröffentlichung als Internationale Norm erfordert Zustimmung von mindestens 75 % der abstimmenden Mitgliedskörperschaften.

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.

Die Internationale Norm ISO 16387 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological methods*, erarbeitet.

## Einleitung

Diese Internationale Norm wurde auf der Basis einer von der Internationalen Organisation für Normung (ISO) und der Organisation für wirtschaftliche Entwicklung und Zusammenarbeit (OECD) empfohlenen Richtlinie entwickelt (siehe Abschnitt 2 und Literaturhinweise).

Dieses Verfahren wurde für die Untersuchung der Wirkungen von in einen künstlichen Boden eingemischten Chemikalien entwickelt. Nach entsprechender Anpassung eignet sie sich auch für die Untersuchungen an belasteten Böden, z. B. nach einer Bodensanierung, siehe Anhang G. Des Weiteren kann sie für die Untersuchung subletaler Effekte und No-Effect-Levels von Pflanzenschutzmitteln modifiziert werden.

Bodenbewohnende Anneliden der Gattung *Enchytraeus* sind ökologisch wichtig, d. h., sie kommen in vielen Böden vor, in denen Regenwürmer selten auftreten, können jedoch auch hohe Populationsdichten in Böden aufweisen, die ebenfalls von Regenwürmern bewohnt sind. *Enchytraeidae* können sowohl in Laboratoriumsuntersuchungen als auch in Semi-Gelände- und Freilanduntersuchungen eingesetzt werden. Unter praktischen Gesichtspunkten ist die Handhabung und Zucht vieler *Enchytraeus*-Arten einfach, ihre Vermehrungszeit ist erheblich kürzer als die von Regenwürmern (die Prüfdauer eines Vermehrungstests mit *Enchytraeidae* beträgt 4 bis 6 Wochen verglichen mit 12 Wochen (einschließlich Synchronisation) mit Regenwürmern).

## 1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von chemischen Substanzen oder kontaminierten Böden auf die Reproduktionsleistung und das Überleben des Kleinborstenwurms *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*). Die zu prüfenden Substanzen werden in definierten Konzentrationen einem künstlichen Bodensubstrat beigemischt; ihre Aufnahme in die Würmer kann dabei über die Haut und über die Nahrung erfolgen.

Diese Internationale Norm ist anwendbar für in Wasser unlösliche oder lösliche Prüfsubstanzen, wobei sich die Art der Applikation unterscheidet. Das Verfahren eignet sich nicht für flüchtige Substanzen, deren Henry-(H-)Konstante oder Luft/Wasser-Verteilungskoeffizient größer als 1 oder deren Dampfdruck bei 25 °C größer als 0,0133 Pa ist. Die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck der Prüfsubstanz sollten bekannt sein. Außerdem sind Informationen über die Persistenz der Prüfsubstanz im Boden wünschenswert.

ANMERKUNG 1 Grundlagen zur Ökologie und Ökotoxikologie von *Enchytraeidae* in der terrestrischen Umwelt enthalten die Literaturhinweise.

ANMERKUNG 2 Es kann nicht sichergestellt werden, dass die Prüfsubstanz während der gesamten Versuchsdauer stabil bleibt. Das beschriebene Prüfverfahren zieht einen Abbau der Prüfsubstanz nicht in Betracht.

ANMERKUNG 3 Hinweise, wie das Verfahren für die Untersuchung belasteter Böden bzw. zur Beurteilung der Bodenbeschaffenheit angepasst werden kann, enthält Anhang B.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 11268-2:1996, *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 2: Determination of effects on reproduction*.

OECD Guideline No 207, 1984: *Earthworm Acute Toxicity Tests*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

### 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

#### 3.1

##### **Reproduktionsrate**

Anstieg der durchschnittlichen Anzahl an Jungtieren je Prüfgefäß nach 6 Wochen

#### 3.2

##### **letale Konzentration für 50 % der Prüforganismen**

##### **LC50**

diejenige Konzentration der Prüfsubstanz, durch die 50 % der Prüforganismen während der Dauer der Vorprüfung oder der Hauptprüfung getötet werden

ANMERKUNG 1 Die LC50 wird angegeben in Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des Prüfsubstrats.

ANMERKUNG 2 Es ist die mittlere letale Konzentration.

#### 3.3

##### **LOEC**

**(en: lowest observed effect concentration)**

die niedrigste in der Prüfung verwendete Konzentration der Prüfsubstanz, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Wirkung auf die Reproduktion der Würmer (Wahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ ) während einer definierten Expositionsdauer zeigt

ANMERKUNG 1 Konzentrationsangaben in Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des Prüfsubstrats.

ANMERKUNG 2 Dabei ist zu beachten, dass alle Konzentrationen oberhalb der LOEC einen negativen Effekt (mindestens gleich dem bei der LOEC beobachteten) haben sollten. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, sollte die Bestimmung der LOEC [und damit auch der NOEC] (siehe 3.4) detailliert erklärt werden.

ANMERKUNG 3 In dieser Prüfung werden Wirkungen auf die Reproduktion (d. h. die Anzahl der Jungtiere) als Prüfparameter verwendet.

#### 3.4

##### **NOEC**

**(en: no observed effect concentration)**

Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikanten Wirkungen (Wahrscheinlichkeit  $p > 0,05$ ) während einer definierten Expositionsdauer beobachtet werden

ANMERKUNG In dieser Prüfung werden Wirkungen auf die Reproduktion (d. h. die Anzahl der Jungtiere) als Prüfparameter verwendet.

#### 3.5

##### **EC<sub>x</sub>**

**(en: effect concentration)**

die Konzentration, die zu einer x-(10, 25, 50)prozentigen Ausprägung einer bestimmten Wirkung, z. B. der Hemmung der Reproduktion, führt

ANMERKUNG Zum Beispiel ist die EC50 diejenige geschätzte Konzentration, bei der eine 50 %ige Minderung der Reproduktionsrate im Vergleich zur Kontrolle am Prüfende auftritt. Alle Wirkungskonzentrationen werden ausgedrückt als Masse der Prüfsubstanz bezogen auf die Trockenmasse des Prüfsubstrates.

## 4 Kurzbeschreibung

Adulte *Enchytraeidae* werden einer Reihe von Konzentrationen einer im künstlichen Boden eingemischten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Prüfung kann in zwei Stufen unterteilt werden: eine Vorprüfung zur Eingrenzung von Konzentrationsbereichen (2 Wochen), mit der der Bereich toxischer Wirkung (im Wesentlichen die Mortalität) bestimmt wird, und eine Hauptprüfung (6 Wochen), mit der das Überleben parentaler Würmer und die Fekundität (Anzahl an Jungtieren) ermittelt werden. Üblicherweise werden die Prüfungen wie folgt durchgeführt:

- a) Für Prüfsubstanzen mit unbekannter Toxizitätsfreisetzung ist die Durchführung der Kurzzeitprüfung für eine Dauer von 14 d einschließlich der Angabe solcher Konzentrationen, die zur vollständigen Mortalität und zum Nichtauftreten letaler Wirkungen führen. Die resultierende Dosis-Wirkungs-Beziehung ist für die zielführende Planung der Hauptprüfung wichtig.
- b) Die Hauptprüfung zur Bestimmung von Konzentrationen einer Prüfsubstanz, die, in einem künstlichen Boden eingemischt, zu einer definierten signifikanten oder spezifischen Wirkung auf die Reproduktionsleistung führt. Diese Prüfung beinhaltet die Untersuchung letaler Wirkungen bei den parentalen *Enchytraeidae*. Die Gesamtdauer der Hauptprüfung beträgt 6 Wochen (bei Verwendung einer anderen *Enchytraeus*-Spezies als *E. albidus* kann sich die Prüfdauer verringern). Nach den ersten drei Wochen werden die adulten Würmer entfernt und die Anzahl der lebenden Würmer und morphologischer Veränderungen (z. B. Körper oder Fragmentierung des Wurms) aufgezeichnet. Nach weiteren drei Wochen wird die Anzahl der Jungtiere, die aus den Kokons geschlüpft sind, gezählt. Die NOEC- und ECx-Werte für die Reproduktionsleistung werden bestimmt.

## 5 Materialien

Das Prüfsubstrat und die Prüfsubstanz werden mit Standard-Laborausrüstung behandelt in Glasgefäßen aufbewahrt.

### 5.1 Biologisches Material

Die empfohlene Prüfspezies ist *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (Weißer Topfwurm, *Enchytraeidae*, *Oligochaeta*, *Annelida*). *E. albidus* ist einer der größten Vertreter, 15 mm bis 40 mm Körperlänge, und ist weltweit verbreitet (siehe Verweise in den Literaturhinweisen). Er kann durch 2 Merkmale leicht erkannt werden. 4 Borsten je Büschel an der Bauchseite sowie der sehr lange Samenkanal im Clitellarbereich und einige Segmente dahinter. Die Art wird in marinen, limnischen und terrestrischen Habitaten, oft in Ansammlungen organischen Materials (Seetang, Kompost) und, teilweise, in Wiesen gefunden. Diese breite ökologische Toleranz sowie die morphologische Variabilität deuten darauf hin, dass diese Art in verschiedenen Rassen (oder Ökotypen) vorkommt.

*E. albidus* ist kommerziell erhältlich, da die Tiere als gutes Futter für Zierfische gelten. Jede neu erworbene Kultur sollte daraufhin untersucht werden, ob sie durch andere, meist kleinere Arten kontaminiert ist (siehe Verweise in den Literaturhinweisen). Wenn eine solche Vermischung auftritt, müssen alle Würmer in einer Petrischale mit Wasser aufgeschwemmt werden. Mit Hilfe eines Binokulars sind dann große, adulte Individuen von *E. albidus* zu Beginn einer neuen Zucht auszuwählen. Der Rest der alten Kultur ist zu entsorgen. *E. albidus* kann leicht in einer Vielzahl organischer Materialien gezüchtet werden (siehe Anhang E). Die Art hat einen kurzen Generationszyklus und wird geschlechtsreif zwischen 33 d (bei 18 °C) und 74 d (bei 12 °C). Nur Tiere, die mindestens 5 Wochen (d. h. einen Generationszyklus) ohne Probleme gehalten wurden, dürfen für eine Prüfung verwendet werden.

Andere Arten der Gattung *Enchytraeus*, z. B. die im Boden lebende, aber kleinere Art *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 oder *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 sind ebenfalls geeignet als Prüforganismen (siehe Anhang F). Wenn andere Arten der Gattung *Enchytraeus* verwendet werden, müssen diese eindeutig bestimmt werden. Die Gründe, die für ihre Auswahl entscheidend waren, sollten genannt sowie alle Abweichungen von diesem Prüfverfahren in diesem Fall aufgezeichnet werden.

Die in der Prüfung eingesetzten Würmer sollten adult (d. h. mit Eiern (weiße Punkte) im Clitellarbereich) sein und sollten ungefähr die gleiche Größe (etwa 15 mm) haben. Eine Synchronisation der Zucht ist nicht notwendig. Die *Enchytraeidae* sollten in unbehandeltem künstlichen Bodensubstrat mindestens 24 h vor Prüfbeginn unter Prüfbedingungen akklimatisiert werden. Während dieser Zeit sollte das gleiche Futter wie später in der Prüfung in ausreichender Menge verwendet werden.

Für eine Prüfung sollte ohne genauere Beobachtung eine Anzahl an adulten Würmern, die größer als die später notwendige Anzahl ist, aus den Zuchtboxen entnommen werden. Am Ende der Akklimatisierungsphase werden nur Tiere mit Eiern, die keine Verhaltensauffälligkeiten zeigen (z. B. nicht versuchen, das künstliche Bodensubstrat zu verlassen), verwendet. Für die Auswahl werden die Tiere in eine mit etwas Wasser gefüllte Petrischale übertragen. Mit Hilfe eines Binokulars sind dann Tiere ohne Eier auszusondern. Nach Möglichkeit sollte dabei ein Frischwasser-Medium (z. B. künstliches Wasser nach der OECD-Leitlinie 202) verwendet werden, da demineralisiertes oder Leitungswasser (letzteres z. B. wegen seines Kupfergehalts) die *Enchytraeidae* schädigen könnten. Während dieser Auswahl sind alle anderen, in den Zuchten vorkommenden Tiere, wie Milben, ebenfalls zu entfernen.

## 5.2 Prüfsubstrat

Das künstliche Bodensubstrat ist nach dem OECD-Leitfaden 207 und ISO 11268-2 vorzubereiten. Es besteht aus den folgenden Bestandteilen (alle Angaben in Prozent der Trockenmasse):

- 10 % Sphagnum-Torf [luftgetrocknet und fein gemahlen ( $2\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$ )]; neu erworbene Ballen sollten in einer Vorprüfung hinsichtlich toxischer Wirkungen auf die Würmer geprüft werden;
- 20 % Kaolin-Ton (Kaolinitgehalt möglichst über 30 %);
- etwa 69 % (in Abhängigkeit von der benötigten  $\text{CaCO}_3$ -Menge) luftgetrockneter industrieller Quarzsand (vorwiegend Feinsand mit mehr als 50 % Partikeln der Korngrößen 0,05 mm bis 0,2 mm).

Etwa 0,3 % bis 1,0 % Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ , pulverförmig, chemisch rein) sind zur Einstellung eines pH-Werts von  $6,0 \pm 0,5$  zuzugeben.

Die benötigte Menge an Calciumcarbonat hängt von den Eigenschaften des jeweiligen Ansatzes an künstlichem Bodensubstrat (speziell des Torfs) ab und sollte durch Messung von Teilproben unmittelbar vor Prüfbeginn bestimmt werden.

Das künstliche Bodensubstrat wird durch sorgfältiges Mischen der oben genannten trockenen Bestandteile in einem großen Labormixer ungefähr eine Woche vor Prüfbeginn hergestellt. Das angesetzte künstliche Bodensubstrat muss für mindestens 2 d bei Raumtemperatur gelagert werden, damit sich ein Säuregleichgewicht einstellen kann.

Ein oder zwei Tage vor Prüfbeginn wird das trockene künstliche Bodensubstrat für die Bestimmung des pH-Wertes und der maximalen Wasserhaltekapazität durch Zugabe von ungefähr der Hälfte derjenigen Wassermenge angefeuchtet, die nötig ist, um den endgültigen Feuchtegrad von 40 % bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität zu erhalten. Anschließend ist der pH-Wert nach Mischung von künstlichem Bodensubstrat mit einer KCl-Lösung [ $c(\text{KCl}) = 1\text{ mol/l}$ ] in einem Verhältnis von 1:5 zu messen (siehe Anhang C). Wenn der gemessene pH-Wert sich nicht in dem erforderlichen Bereich befindet, muss eine entsprechende Menge an  $\text{CaCO}_3$  zugegeben oder ein neuer Ansatz von künstlichem Bodensubstrat hergestellt werden. Parallel zur Bestimmung des pH-Werts ist die maximale Wasserhaltungskapazität des künstlichen Bodensubstrats nach Anhang D zu bestimmen.

Danach wird das künstliche Bodensubstrat in so viele Teilmengen unterteilt, wie Konzentrationen einschließlich Kontrolle für die spätere Prüfung geplant sind. Bis zum Prüfbeginn ist dabei Verdunstung zu vermeiden.

Der endgültige Feuchtegrad wird durch Zugabe von Wasser zusammen mit oder parallel zur Einmischung der Prüfsubstanz erreicht. Die Feuchtemessung erfolgt am Prüfbeginn und -ende durch Trocknung einer kleinen Probe bei 105 °C und Gegenwägung. In jedem Fall sollten die Substanzen für die Würmer optimal sein (auch wenn aufgrund der verwendeten Torfballen die Feuchtwerte nicht eingehalten werden. In Zweifelsfällen sollte die Feuchte wie folgt überprüft werden: Wenn eine kleine Menge an künstlichem Bodensubstrat vorsichtig mit der Hand zusammengedrückt wird, sollten kleine Wassertropfen zwischen den Fingern auftauchen).

**5.3 Futter**, mit einer Qualität, die es ermöglicht, zumindest die *Enchytraeidae*-Population aufrechtzuerhalten

Haferflocken, möglichst autoklaviert (oder erhitzt), um Verunreinigungen der Zucht mit anderen Organismen zu vermeiden, sind besonders geeignet. Zum Prüfbeginn werden 50 mg gemahlener Haferflocken je Prüfgefäß in das Prüfsubstrat eingemischt (nach Applikation der Prüfsubstanz aber vor Zugabe der Würmer); bei weiteren Fütterungen werden 25 mg je Prüfgefäß und Woche (außer nach 28 d) nur auf die Oberfläche des Prüfsubstrats aufgestreut, um Störungen der Würmer zu vermeiden. Allerdings sollten einige Bodenpartikel auf das Futter gelegt werden, um das Wachstum von Pilzen zu behindern.

**5.4 Bengal-Rot, Ethanol.**

## **6 Geräte**

Übliche Laborausstattung, speziell aber die folgenden Gerätschaften, sind notwendig:

**6.1 Becherglas**, 0,20 l bis 0,25 l, Durchmesser etwa 6 cm, mit Deckel (z. B. Glas oder Kunststofffolie).

Die Becher enthalten künstliches Bodensubstrat, das einer Trockenmasse von 20 g entspricht und müssen als Prüfgefäße geeignet sein. Die Deckel müssen einen Gasaustausch zwischen Bodensubstrat und Atmosphäre erlauben.

**6.2 Trockenschrank.**

**6.3 Binokular.**

**6.4 Waagen** mit einem Wägebereich von 50 g bis 32 kg; Wägung mindestens auf 1 g.

**6.5 Analysenwaage** mit einem Wägebereich von 25 mg bis 200 g; Wägung mindestens auf 1 mg.

**6.6 pH-Messgerät.**

**6.7 Temperaturmessgeräte** (z. B. Temperatur-/Feuchte-Rekorder).

**6.8 Belichtungsmesser.**

**6.9 Mixer.**

**6.10 Brutschrank oder ein kleiner Raum mit Klimakontrolle.**

**6.11 Federstahlpinzette, Haken, Schlingen oder schmale Bürsten.**

**6.12 Photoschalen** mit gewelltem Boden.