

DIN ISO 17512-1



ICS 13.080.10

**Bodenbeschaffenheit –
Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der
Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten –
Teil 1: Prüfung von Regenwürmern (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*)
(ISO 17512-1:2008)**

Soil quality –

Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour –
Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)
(ISO 17512-1:2008)

Qualité du sol –

Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets des produits chimiques sur
le comportement –

Partie 1: Essai avec des vers de terre (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*)
(ISO 17512-1:2008)

Gesamtumfang 32 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung des Verfahrens	8
5 Reagenzien und Materialien	8
6 Geräte.....	9
7 Prüfverfahren	11
7.1 Geeigneter Konzentrationsbereich	11
7.2 Prüfen der Böden.....	11
7.3 Prüfung auf Chemikalien	12
7.4 Referenzsubstanz	12
7.5 Gültigkeitskriterien	12
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	12
9 Prüfbericht.....	13
Anhang A (informativ) Prüfgefäße	15
Anhang B (informativ) Beispiel eines Anzuchtverfahrens für <i>Eisenia fetida</i> und <i>Eisenia andrei</i>	18
Anhang C (informativ) Weitere Prüforganismen	19
Anhang D (informativ) Verunreinigungen, die Regenwürmer erkennen können und bei der Vermeidungsprüfung meiden.....	20
Anhang E (normativ) Prüfen der Chemikalien in der Vermeidungsprüfung	21
Anhang F (normativ) Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens.....	23
Anhang G (informativ) Vergleich der in Zweikammerprüfgefäßen und in Sechskammerprüfgefäßen erhaltenen Ergebnisse.....	24
Anhang H (informativ) Einfluss der Bodeneigenschaften auf das Vermeidungsverhalten — Grundlage für den Schwellenwert von 20 %.....	27
Anhang I (informativ) Ergebnisse aus „dualen“ Prüfungen mit dem gleichen (unbehandelten) Kontrollboden auf beiden Seiten des Prüfgefäßes	29
Literaturhinweise	31
Bilder	
Bild A.1 — Beispiel für ein Zweikammerprüfgefäß	15
Bild A.2 — Beispiel für ein Sechskammerprüfgefäß.....	16
Bild A.3 — Details eines Sechskammerprüfgefäßes.....	17

Tabellen

Tabelle G.1 — Eigenschaften der angewendeten Böden	24
Tabelle G.2 — Ergebnisse der Prüfungen.....	25
Tabelle G.3 — Gesamtanzahl von <i>Eisenia andrei</i> , die in den beiden Behandlungen (z. B. Kontrolle bzw. behandeltem Boden) und Prüfkonzentrationen nach einer 48-stündigen Exposition gegenüber Borsäure in einem Boden (Alberta-Schwarz-Chernozem-Boden) im Zweikammer- bzw. Sechskammerprüfgefäß gefunden wurden	26
Tabelle G.4 — Berechnete EC ₅₀ mit den zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichen für die Vermeidungsprüfung im Sechskammer- und Zweikammerprüfgefäß (<i>Eisenia andrei</i> wurde Borsäure in einem Boden (Alberta-Schwarz-Chernozem-Boden) für 48 h ausgesetzt)	26
Tabelle H.1 — Eigenschaften des nicht verunreinigten Bodens	27
Tabelle H.2 — Prozentzahl an Würmern im Boden der Kammer A (Mittelwerte aus fünf Wiederholungen)	27
Tabelle H.3 — Versuche mit dem gleichen Boden in beiden Kammern – Prozentzahl der im Abschnitt mit der kleinsten Anzahl an Organismen von jedem Versuch vorliegenden Würmer (unabhängig, ob Abschnitt A oder B)	28
Tabelle I.1 — Überblick über die Ergebnisse aus der „dualen“ Prüfung mit verschiedenen Böden (Prüfdauer 48 h)	30

Nationales Vorwort

Diese Norm wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Bodenbeschaffenheit“ aufgestellt. Für Deutschland war der NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ an der Bearbeitung beteiligt.

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

In Deutschland wird die Anwendung der Zweikammerprüfgefäße als Vorzugssystem empfohlen.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

DIN ISO 17512 besteht aus folgenden Teilen, die unter dem Haupttitel *Bodenbeschaffenheit — Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten* veröffentlicht werden:

— Teil 1: Prüfung mit Regenwürmern (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*)

— Teil 2: Prüfung mit Collembolen (*Folsomia candida*)

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

ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 11268-1:1993	siehe	DIN ISO 11268-1:1997
ISO 11268-2:1998	siehe	DIN ISO 11268-2:2000
ISO 11269-2	siehe	DIN ISO 11269-2
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465
ISO 15799	siehe	DIN ISO 15799

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 11268-1:1997, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida) — Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Boden-substrat*

DIN ISO 11268-2:2000, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida) — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung (ISO 11268-1:1998)*

DIN ISO 11269-2, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 2: Wirkung von Schadstoffen auf Saataufgang und Wachstum höherer Pflanzen*

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

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

Bodenbeschaffenheit — Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten — Prüfung mit Regenwürmern (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*)

Einleitung

Ökotoxikologische Prüfsysteme werden angewendet, um Informationen über die Auswirkungen von Verunreinigungen im Boden zu erhalten, und sind zur Ergänzung herkömmlicher chemischer Analysen vorgesehen (siehe ISO 15799). ISO 15799 enthält eine Liste und kurze Charakterisierung der empfohlenen und genormten Prüfsysteme. Aquatische Prüfsysteme mit Bodeneluat werden angewendet, um Informationen über den Anteil der Verunreinigungen zu erhalten, der über den Wasserweg (Rückhaltefunktion von Böden) das Grundwasser erreichen kann, wogegen die terrestrischen Prüfsysteme zum Bewerten der Lebensraumfunktion von Böden angewendet werden. Als genormte Prüfsysteme zur Untersuchung der Lebensraumfunktion eines Bodens in Bezug auf Regenwürmer als Vertreter der Bodenbiozönose bestehen eine Sterblichkeitsprüfung (ISO 11268-1) und eine Reproduktionsprüfung (ISO 11268-2).

Die Reproduktionsprüfung mit Regenwürmern (ISO 11268-2) wird angewendet, um die auf subletalen Konzentrationen beruhenden Auswirkungen nachzuweisen. Derartige Endpunkte werden bevorzugt angewendet, um Angaben über Umweltauswirkungen zu erhalten. Die Reproduktionsprüfung ist jedoch sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig, erfordert lange Inkubationszeiten und liefert Ergebnisse erst nach 56 Tagen. Da die Prüfdauer und der Arbeitsaufwand die Kosten einer vorgegebenen Prüfung bestimmen, ist es vorzuziehen, die Ergebnisse innerhalb einer kurzen Prüfdauer und bei einem hohen Empfindlichkeitsniveau zu erhalten. Dies gilt insbesondere bei der Bewertung von sanierten Böden. Diese Möglichkeit bietet die Vermeidungsprüfung mit *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*. Die Erfahrungen aus einem Ringversuch mit acht verunreinigten Böden in drei Laboratorien zeigen, dass die Vermeidungsprüfung genauso empfindlich wie die Reproduktionsprüfung ist [5]. Es besteht jedoch nicht die Absicht, mit dieser Prüfung den Regenwurm-Reproduktionstest zu ersetzen.

ANMERKUNG Die Ergebnisse wurden mit denjenigen der akuten Prüfung und der Reproduktionsprüfung verglichen, die an Regenwürmern mit den gleichen Böden durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass bei einem Kriterium von > 80 % Vermeidungsansprechen eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 72 % erzielt wurde.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Screening-Schnellverfahren zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden und des Einflusses von Verunreinigungen und Chemikalien auf das Verhalten von Regenwürmern fest.

Die subletale Prüfung ist ein Schnellverfahren, das die Bioverfügbarkeit von Gemischen aus Verunreinigungen in natürlichen Böden und von in Böden eingemischten Substanzen für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* wiedergibt. Das Vermeidungsverhalten der Würmer stellt den Endpunkt der Prüfung dar. Die Prüfung ist nicht als Ersatz für den Regenwurm-Reproduktionstest vorgesehen.

Zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen (ein Zweikammerprüfgefäß und ein Sechskammerprüfgefäß) wurden entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Beide Versuchsanordnungen sind sowohl für Prüfungen auf Einzelkonzentrationen (z. B. zur Bewertung der Beschaffenheit eines Feldbodens) als auch für Prüfungen auf Mehrfachkonzentrationen (z. B. zur Bewertung der Toxizität einer zugesetzten Chemikalie) anwendbar. In beiden Fällen ist es den Regenwürmern überlassen anfänglich zu wählen, in welches Segment, ob in den Kontroll- oder Prüfboden, sie eindringen [im Zweikammerprüfgefäß zwischen der linken und der rechten Seite; im Sechskammerprüfgefäß zwischen den (3 + 3) sich abwechselnden Kammern].

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 10390, *Soil quality — Determination of pH*

ISO 11268-2:1998, *Soil quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) — Part 2: Determination of effects on reproduction*

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

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

ISO 15799, *Soil quality — Guidance on the ecotoxicological characterization of soil and soil materials*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Vermeidungsverhalten

Neigung (eines Organismus), unter Bevorzugung des Kontrollbodens den Prüfboden zu meiden

3.2

Lebensraumfunktion

Eigenschaft von Boden/Bodenmaterialien, als Lebensraum für Mikroorganismen, Pflanzen, Bodenlebewesen und deren Interaktionen (Biozönose) zu dienen

[ISO 15799:2003]

ANMERKUNG Ökotoxikologische Prüfungen als Indikatoren für die Lebensraumfunktion liefern Informationen über die jeweiligen Prüfparameter, z. B. akuter Versuch auf Überleben oder chronischer Versuch auf Reproduktion.

3.3

eingeschränkte Lebensraumfunktion

die Lebensraumfunktion (3.2) ist eingeschränkt, wenn im Mittel mehr als 80 % der Würmer im Kontrollboden gefunden werden (Anzeige einer Auswirkung auf das Verhalten)

3.4

effektive Konzentration

EC_x

Konzentration, bei der eine bestimmte Auswirkung nachgewiesen wird [wobei x der Prozentwert (10, 25, 50) dieser Auswirkung, z. B. Vermeidung, ist]

BEISPIEL In dem vorliegenden Dokument ist die EC_{50} als die Konzentration einer Substanz oder eines Gemisches von Substanzen im Boden zu verstehen, bei der erwartet wird, dass 50 % der Versuchsregenwürmer Vermeidungsverhalten zeigen.

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Zehn adulte Regenwürmer (der Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*) werden zur gleichen Zeit einem Kontrollboden und einem verunreinigten Boden oder einem Boden mit Prüfsubstanzen ausgesetzt. Der Prüfboden und der Kontrollboden werden in jedes Prüfgefäß gegeben und den Regenwürmern so eine Wahl zwischen Prüf- und Kontrollboden gelassen. Es gibt zwei Arten von Prüfgefäßen:

- a) ein Zweikammerprüfgefäß;
- b) ein Sechskammerprüfgefäß.

Nach einer Inkubationsdauer von zwei Tagen wird die Anzahl an Würmern in jedem Segment des Gefäßes bestimmt.

Einzelprüfungen (z. B. Prüfung mit Borsäure in einem der beiden Prüfgefäße in unterschiedlichen Laboratorien) oder Vergleichsuntersuchungen (Prüfung mit derselben Chemikalie oder demselben Boden im gleichen Laboratorium, z. B. [8]) haben in einigen Fällen zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Kürzlich wurden beide Prüfgefäßarten in Ringversuchen in Kanada [2] und Frankreich validiert. Jedoch wurde bisher noch kein Ringtest durchgeführt, in dem beide Prüfgefäßarten nebeneinander verwendet wurden. Daher liegt zurzeit die Wahl der Prüfgefäßart beim Versuchsdurchführenden. Bei der Wahl sollten außerdem praktische Aspekte wie die Kosten der Prüfeinheiten und die Menge an anfallendem Abfall berücksichtigt werden.

5 Reagenzien und Materialien

5.1 Borsäure als empfohlene Referenzsubstanz. H_3BO_3 wurde in der Vergangenheit als ein chemisches Bodendesinfektionsmittel verwendet und ist ein wirksames nicht-selektives Biozid (relative Molekülmasse: 61,81). Regenwürmer können subletale Konzentrationen, die die Reproduktion nachteilig beeinflussen, erkennen und vermeiden. Borsäure erfüllt die folgenden Kriterien, die ihre Eignung als eine Referenzsubstanz bestätigen:

- a) wirksam bei relativ geringen Konzentrationen, die von der Art des Substrats nicht stark beeinflusst werden;
- b) relativ stabil und persistent, so dass keine starken Änderungen der Konzentrationen über die Prüfdauer auftreten;
- c) relativ gut wasserlöslich bzw. mit Wasser mischbar, nicht stark flüchtig, leicht mischbar mit Böden;
- d) genormtes Verfahren zum Messen von Borsäurekonzentrationen im Boden vorhanden;
- e) geringfügige Gefährdung des Personals und problemlose Entsorgung.

5.2 Biologisches Material, bestehend aus adulten Regenwürmern der Arten *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei* (Einzelbiomasse: zwischen 300 mg und 600 mg). Die zeitliche Abstimmung beim Züchten der Organismen ist für diese Prüfung nicht erforderlich. Ein Beispiel zur Anzucht von Kompostwürmern ist in Anhang B angegeben.

Die ausgewählten Würmer sind für mindestens einen Tag im gewählten Kontrollboden (5.4) zu konditionieren.

ANMERKUNG *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sind Kompostwürmer. Ökologisch betrachtet, sind diese nicht die bedeutendsten in Böden auftretenden Arten [7]. Andererseits sind Kompostwürmer in praktischer Hinsicht besser geeignet als jede andere *Lumbricidenart*, da sie sich im Laboratorium sehr schnell und einfach vermehren (d. h. sie können in Massenkulturen gehalten werden). Außerdem liegt die Empfindlichkeit dieser Arten im Vergleich zu anderen Regenwurmart mehr oder weniger in der gleichen Größenordnung. In den meisten Fällen variieren die Arten in akuten oder chronischen Prüfungen [6], [7] in Abhängigkeit von der untersuchten Chemikalie oder dem untersuchten Gemisch aus Verunreinigungen um nicht mehr als um den Faktor 10. Obwohl andere Regenwurmart bereits erfolgreich in Vermeidungsprüfungen verwendet worden sind (siehe Anhang C), ist ein Faktor, der die Spanne ihres Vermeidungsverhaltens beschreibt, noch nicht bekannt.

5.3 Prüfsubstrat. Der zu prüfende Boden sollte gesiebt (Maschenweite 2 mm) und auf etwa 60 % des maximalen Wasserrückhaltevermögens eingestellt werden. Der bestmögliche Wassergehalt ist erzielt, wenn kein stehendes oder freies Wasser beim Zusammendrücken des Bodens auftritt.

ANMERKUNG Bei stark schluffigen und lehmigen Böden kann es schwierig sein, die erforderliche Menge an Boden mit annehmbarem Arbeitsaufwand auf ≤ 2 mm zu sieben. Die Löcher im Sieb können innerhalb einiger Minuten verstopfen. Dies macht ein häufiges Reinigen erforderlich. Es ist in diesem Fall zulässig, die für die Prüfung benötigte Menge Boden auf ≤ 4 mm zu sieben.

Der Wassergehalt sowie der pH-Wert in 1 mol/l KCl sind nach ISO 11465 bzw. ISO 10390 unmittelbar vor Prüfbeginn zu bestimmen. Zusätzlich ist das maximale Wasserrückhaltevermögen nach Anhang F zu bestimmen.

5.4 Kontrollboden: Drei Möglichkeiten stehen zur Auswahl (siehe auch ISO 15799). Möglichkeit a) wird bevorzugt, da ein derartiger Boden jedoch oft nicht verfügbar ist, kann sowohl ein Standardboden, b), als auch ein künstlicher Boden, c), verwendet werden (die möglichen Einflüsse dieser Böden sind im 80 %-Bewertungskriterium berücksichtigt, siehe Abschnitt 8).

- a) ein dem Prüfboden hinsichtlich aller Eigenschaften außer der Anwesenheit von Verunreinigungen ähnlicher Kontrollboden;
- b) ein Boden mit den Eigenschaften nach ISO 11269-2 [$C_{org} \leq 1,5$ %, Sandgehalt (0,063 mm bis 2 mm) von 50 % bis 75 %, < 20 % der Partikel kleiner als 0,02 mm, pH-Wert von 5 bis 7,5];
- c) ein künstlicher Boden nach ISO 11268-2.

Natürliche Böden sollten gesiebt und deren Wassergehalt nach 5.3 eingestellt werden.

6 Geräte

Übliche Laborausrüstung und im Speziellen folgende.

6.1 Behälter (siehe Anhang A).

6.1.1 Zweikammerprüfgefäß: Behälter mit einem Fassungsvermögen von 1 l bis 2 l und einer Querschnittsfläche von etwa 0,02 m², so dass eine Bodentiefe von 50 mm bis 60 mm erreicht wird.

Die Prüfbehälter müssen den Gasaustausch zwischen dem Medium und der Atmosphäre und den Lichteinfall zulassen (z. B. durch einen perforierten, lichtdurchlässigen Deckel) und Vorkehrungen aufweisen, die eine Flucht der Würmer verhindern (z. B. Verwendung von Klebeband zum Befestigen des Deckels). Um Auswirkungen des seitlichen Lichteinfalls zu vermeiden, müssen Glasgefäße umwickelt werden.

Zweikammerprüfgefäße sind im Handel erhältlich¹⁾.

ANMERKUNG Aufgrund der kurzen Prüfdauer und dem verhältnismäßig großen Bodenvolumen in den Gefäßen ist eine auf Sorption an den Gefäßwänden beruhende Verminderung der Chemikalienkonzentration im Boden vernachlässigbar. Trotzdem ist ein inerter Werkstoff (z. B. Glas oder nichtrostender Stahl) vorzuziehen.

6.1.2 Sechskammerprüfgefäß (kreisförmige Prüfeinheiten):

- 1) nichtrostender Stahl zum Prüfen von mit organischen Verbindungen verunreinigtem Boden;
- 2) Kunststoff (inert Kunststoff hoher Dichte) zum Prüfen von mit Metallen oder Metallverbindungen verunreinigtem Boden.

Die runde Prüfeinheit hat ein Mittelsegment mit sechs tortenstückförmig getrennten und durch Löcher miteinander verbundenen Segmenten, in die der Prüfboden gegeben wird. Die Verbindungslöcher befinden sich entlang dem Boden der Kammerwände (drei je Seite) und der Zentralkammer (zwei je Seite), so dass sich die Würmer frei zwischen den Kammern bewegen können. Die Kunststoffprüfeinheit sollte mit einem lichtundurchlässigen Material (Aluminiumfolie) umwickelt werden, um Lichteinfall zu verhindern. Es sind Vorkehrungen notwendig, um eine Flucht der Würmer zu verhindern.

Sechskammerprüfgefäße sind im Handel nicht erhältlich. Daher sind alle Einzelheiten zum Bau dieser Gefäße in den Bildern und im Text angegeben.

6.2 Trennvorrichtung (z. B. Kunststoff oder dünne Metallbleche):

- a) für das Zweikammerprüfgefäß, zum senkrechten Teilen der Behälter in zwei gleiche Hälften;
- b) für das Sechskammerprüfgefäß, zum Entlangführen an den Kammerwänden am Ende einer Prüfung, um jede Kammer zu trennen.

6.3 Ausrüstung zum Messen des Wassergehalts eines Substrats (nach ISO 11465).

6.4 Prüfklima.

6.4.1 Gehäuse oder **Klimakammer**, in dem/der eine Temperatur von (20 ± 2) °C aufrechterhalten werden kann.

6.4.2 Lichtquelle, die bei einem geregelten Hell/Dunkel-Zyklus von 12 h zu 12 h bis 16 h zu 8 h eine konstante Lichtstärke von 400 lx bis 800 lx an die Behälter abgeben kann.

ANMERKUNG Ein Tag/Nacht-Zyklus wurde gewählt, um vergleichbare Bedingungen zur akuten und zur Reproduktionsprüfung herzustellen.

1) Bellaplast Nr. 597 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch ISO.