

DIN EN ISO 17512-1



ICS 13.080.30

Entwurf

Einsprüche bis 2020-03-10
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO 17512-1:2010-06

**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);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17512-1:2019**

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);
German and English version prEN ISO 17512-1:2019

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);
Version allemande et anglaise prEN ISO 17512-1:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-10 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 17512-1:2008 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 17512-1:2020 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsunterausschuss 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 11268-1:1993	siehe	DIN ISO 11268-1:1997-04 (zurückgezogen)
ISO 11268-2:1998	siehe	DIN ISO 11268-2:2000-03 (zurückgezogen)
ISO 11269-2	siehe	DIN EN ISO 11269-2
ISO 15799	siehe	DIN ISO 15799

Änderungen

Gegenüber DIN ISO 17512-1:2010-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Überführung in eine internationale Norm, wobei die europäische Norm vollständig überarbeitet wurde;
- b) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 11268-1:1997-04, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida) — Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat (ISO/DIS 11268-1:1993)*

DIN ISO 11268-2:2000-03, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida) — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung (ISO 11268-2:1998)*

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

— Leerseite —

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)

*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)*

*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)*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	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
7.2.1 Zweikammerprüfgefäß	11
7.2.2 Sechskammerprüfgefäß	11
7.3 Prüfung auf Chemikalien	12
7.4 Referenzsubstanz	12
7.5 Gültigkeitskriterien	12
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	12
9 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Prüfgefäße	15
A.1 Zweikammerprüfgefäß	15
A.2 Sechskammerprüfgefäß	15
Anhang B (informativ) Beispiel eines Anzuchtverfahrens für <i>Eisenia fetida</i> und <i>Eisenia andrei</i>	19
Anhang C (informativ) Weitere Prüforganismen	20
Anhang D (informativ) Verunreinigungen, die Regenwürmer erkennen können und bei der Vermeidungsprüfung meiden	21
Anhang E (normativ) Prüfen der Chemikalien in der Vermeidungsprüfung	22
E.1 Allgemeines	22
E.2 Prüfsubstrat	22
E.3 Kontrollboden	22
E.4 Durchführung	22
E.5 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	23
Anhang F (normativ) Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens	24
Anhang G (informativ) Vergleich der in Zweikammerprüfgefäßen und in Sechskammerprüfgefäßen erhaltenen Ergebnisse	25
G.1 Vergleich der unterschiedlichen Bodenprüfoptionen	25
G.2 Prüfungen mit Borsäure: Vergleich zwischen dem Zweikammer- und dem Sechskammerprüfgefäß	27

Anhang H (informativ) Einfluss der Bodeneigenschaften auf das Vermeidungsverhalten — Grundlage für den Schwellenwert von 20 %	28
Anhang I (informativ) Ergebnisse aus „dualen“ Prüfungen mit dem gleichen (unbehandelten) Kontrollboden auf beiden Seiten des Prüfgefäßes	30
Literaturhinweise	32

Bilder

Bild A.1 — Beispiel für ein Zweikammerprüfgefäß	15
Bild A.2 — Beispiel für ein Sechskammerprüfgefäß	16
Bild A.3 — Details eines Sechskammerprüfgefäßes	18

Tabellen

Tabelle G.1 — Eigenschaften der angewendeten Böden	25
Tabelle G.2 — Ergebnisse der Prüfungen	26
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	27
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)	27
Tabelle H.1 — Eigenschaften des nicht verunreinigten Bodens	28
Tabelle H.2 — Prozentzahl an Würmern im Boden der Kammer A (Mittelwerte aus fünf Wiederholungen)	28
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 Abschnitt B)	29
Tabelle I.1 — Überblick über die Ergebnisse aus der „dualen“ Prüfung mit verschiedenen Böden (Prüfdauer 48 h)	31

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 17512-1:2008 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 17512-1:2019 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 17512-1:2008 wurde von CEN als prEN ISO 17512-1:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

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

Die Hauptaufgabe der Technischen Komitees besteht in dem Erarbeiten von Internationalen 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 Mitgliedsländer, die abgestimmt haben, 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 17512-1 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological methods*, erarbeitet.

ISO 17512 besteht unter dem allgemeinen Titel *Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour* aus den folgenden Teilen:

— *Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*

Der folgende Teil ist in Bearbeitung:

— *Part 2: Test with collembolans (Folsomia candida)*

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

[QUELLE: ISO 15799:2003]

Anmerkung 1 zum Begriff: 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 Regenwurmartenspezies 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 Regenwurmartenspezies 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 [$C_{\text{org}} \leq 1,5$ %, 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 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 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.

7 Prüfverfahren

7.1 Geeigneter Konzentrationsbereich

Die Vermeidungsprüfung dient dem Nachweis subletaler Auswirkungen. Aus diesem Grund ist die Prüfung ungültig, wenn mehr als ein Wurm je Gefäß (d. h. einer von 10) am Ende der Prüfung tot oder nicht auffindbar ist (siehe 7.5). Es wird empfohlen, in einem Vorversuch den Konzentrationsbereich zu ermitteln, um Mortalität zu vermeiden.

7.2 Prüfen der Böden

7.2.1 Zweikammerprüfgefäß

Zu Beginn der Prüfung werden die Gefäße (6.1.1) durch Einsetzen einer senkrechten Trennvorrichtung in zwei gleiche Segmente geteilt. Die Gefäße werden mit gesiebttem Boden bis auf eine Höhe von etwa 50 mm bis 60 mm gefüllt. Eine Hälfte des Gefäßes wird mit dem Prüfboden (Kammer A) und die andere Hälfte mit dem Kontrollboden (Kammer B) gefüllt. Anschließend wird die Trennwand entfernt und es werden 10 Würmer auf die Trennlinie von jedem Prüfgefäß gesetzt (von da aus haben sie die Möglichkeit, sich schnell in den Boden zu graben, wobei sie den von der Trennvorrichtung hinterlassenen Spalt als Ausgangspunkt nutzen können). Die Behälter werden nach 6.1.1 abgedeckt und in die Klimakammer oder das Prüfgehäuse (6.4.1) gestellt.

Während der Prüfung ist kein Füttern der Tiere erforderlich.

Die Prüfung wird mit fünf Wiederholungen je Versuch (Prüfböden, Kontrollböden oder Referenzsubstanz) durchgeführt. Um eine genauere Quantifizierung der Verhaltensauswirkung zu erhalten, kann eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Zum Verdünnen des kontaminierten Bodens sollte der Kontrollboden verwendet werden.

Am Ende der Prüfung (48 h) werden der Kontroll- und der Prüfboden in jedem Gefäß durch Einsetzen der Trennvorrichtungen getrennt. Die Trennvorrichtungen müssen vor dem Entnehmen der Prüfeinheiten aus der Klimakammer eingesetzt werden. Die Anzahl der Würmer wird für beide Segmente der Gefäße ermittelt. Durch Einführen der Trennvorrichtung geteilte Würmer werden unabhängig von der Länge des verbliebenen Körpers als 0,5 gezählt. Von fehlenden Würmer wird angenommen, dass sie entweder aus dem Prüfgefäß geflüchtet oder während der Prüfung verendet sind und sich zersetzt haben (siehe 7.1).

7.2.2 Sechskammerprüfgefäß

Prüf- und Kontrollboden werden vorbereitet (gesiebt, gewässert und durchmischt) und in einer Höhe von 50 mm bis 60 mm (350 ml Boden) jeweils in drei Segmente in abwechselnder Reihenfolge (z. B. die Segmente 1, 3 und 5 enthalten den Prüfboden und die Segmente 2, 4 und 6 den Kontrollboden) gefüllt (siehe auch Anhang E). In der Zentralkammer befindet sich kein Boden. Stattdessen werden dort nacheinander 10 Würmer eingesetzt und die von jedem einzelnen Wurm aufgesuchten Kammern aufgezeichnet. Die Behälter werden verschlossen (6.1.2) und in eine Klimakammer (6.4.1) gestellt.

Während der Prüfung ist kein Füttern der Tiere erforderlich.

Die Prüfung wird bei einer Einzelkonzentrationsprüfung mit fünf Wiederholungen und bei einer Mehrfachkonzentrationsprüfung mit mindestens zwei Wiederholungen durchgeführt. Bei Mehrfachkonzentrationsprüfungen besteht der Prüfboden aus dem mit dem geeigneten Kontrollboden verdünnten Ursprungsboden.

Am Ende der Prüfung (48 h) werden die Trennvorrichtungen eingesetzt, um die weitere Bewegung der Regenwürmer zwischen den Kammern zu unterbinden. Die Trennvorrichtungen müssen vor dem Entnehmen der Prüfeinheiten aus der Klimakammer eingesetzt werden. Die Anzahl der Würmer in jedem

der Segmente wird aufgezeichnet und die Gesamtanzahl innerhalb einer Prüfeinheit für jeden Versuch ermittelt. Durch Einführen der Trennvorrichtungen geteilte Regenwürmer werden unabhängig von der Länge des verbliebenen Körpers als 0,5 gezählt. Von fehlenden Würmern wird angenommen, dass sie entweder aus dem Prüfgefäß geflüchtet oder während der Prüfung verendet sind und sich zersetzt haben (siehe 7.1).

ANMERKUNG Die Annahme der Prüfung besteht darin, dass zu Beginn der Prüfung die Würmer zufällig zwischen den Kammern verteilt sind und am Ende der Prüfung bei einem wahren Vermeidungsansprechen keine zufällige Verteilung der Regenwürmer zwischen den Segmenten eines Gefäßes vorliegt. Wenn zu Beginn der Prüfung die Würmer nicht zufällig verteilt sind, kann es sein, dass keine Vermeidungsreaktion besteht. Alternativ dazu kann zu Beginn der Prüfung eine Vermeidungsreaktion vorliegen, wenn die Würmer das Aufsuchen von Kammern mit kontaminiertem Boden ablehnen und somit sofort diesen Boden meiden. Dies geschieht bei subletalen Konzentrationsniveaus im Boden selten.

7.3 Prüfung auf Chemikalien

Zwar ist der Hauptzweck der Vermeidungsprüfungen die Prüfung von potentiell verunreinigten Böden, es ist jedoch auch möglich, diese Prüfung zur Bewertung von Auswirkungen einzelner Chemikalien anzuwenden, nachdem diese dem Boden zugesetzt worden sind (Beispiele für durch Regenwürmer nachgewiesene Chemikalien sind in Anhang D angegeben). Änderungen in der Vorgehensweise bei der Prüfung einzelner Chemikalien (einschließlich statistischer Verfahren) sind in Anhang E beschrieben.

7.4 Referenzsubstanz

Als Referenzsubstanz wird Borsäure empfohlen. Eine Vermeidungsreaktion sollte bei einer Konzentration von 750 mg H_2BO_3 je Kilogramm Bodentrockenmasse erhalten werden, wenn künstlicher Boden oder ein anderer Kontrollboden verwendet wird. Prüfungen des bodentoxikologischen Labors von „Environment Canada“ ergaben bei einer Prüfung des Vermeidungsverhaltens mit einem Sechskammerprüfgefäß, bei der ein mit Borsäure versetzter Chernozem-Ton-Lehm-Kontrollboden verwendet wurde, eine Borsäure- EC_{50} von 618 mg/kg [8]. Beim Aufzeichnen der EC_{50} -Werte sind auch die wichtigsten Bodeneigenschaften (d. h. pH-Wert, Struktur und Gehalt an organischen Bestandteilen) anzugeben.

7.5 Gültigkeitskriterien

Die Prüfung ist ungültig, wenn die Anzahl an toten oder fehlenden Würmern $> 10 \%$ je Versuch ist.

Zur Validierung des Prüfaufbaus ist die Homogenität der Verteilung der Würmer zu prüfen. Zu diesem Zweck ist das gesamte Prüfgefäß mit dem gleichen Boden zu füllen und es ist sicherzustellen, dass die Ausrichtung der Prüfgefäße im Raum die gleiche ist. Im Durchschnitt sollte das Verhältnis von Würmern im Bereich von 60 % zu 40 % für ein Zweikammerprüfgefäß liegen. Weitere Informationen zur Verteilung von Würmern in solchen dualen Prüfanordnungen mit unterschiedlichen Böden sind in Anhang I angegeben.

8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

Die mittlere Anzahl an lebenden Individuen im Prüfboden ($\pm$ -Standardabweichung) wird für jeden Versuch am Ende der Prüfung bestimmt. Sowohl für die Prüfung im Zweikammerprüfgefäß als auch für die Prüfung im Sechskammerprüfgefäß werden die Ergebnisse als Anzahl an Individuen im Prüfboden je Prüfgefäß angegeben.

Wenn der Prüfboden und der Kontrollboden sich nur hinsichtlich der Verunreinigung unterscheiden, dürfen statistische Berechnungen wie folgt vorgenommen werden.

Bei einer Einzelkonzentrationsprüfung wird die am Ende der Prüfung vorliegende mittlere Anzahl an Individuen im Prüfboden mit dem Mittelwert der Kontrollbodenbehandlung nach dem Fisher Exact-Test oder einem anderen, für paarweise Vergleiche geeigneten statistischen Verfahren verglichen [15].

Ergebnisse, die eine wesentlich kleinere mittlere Anzahl an überlebenden Würmern im Prüfboden im Vergleich zu der im Kontrollboden zeigen, weisen auf ein Vermeidungsansprechen (oder eine Bevorzugung des Kontrollbodens) gegenüber dem Prüfboden hin. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Lebensraumfunktion des Prüfbodens eingeschränkt ist.

Zur Berechnung der prozentualen Wirkung einer Substanzkonzentration wird die mittlere Anzahl an Würmern im Prüfboden mit der mittleren Anzahl an Würmern im Kontrollboden (negative Ansprechwerte, d. h., die Würmer bevorzugen den Prüfboden, werden als 0 % Vermeidung betrachtet) nach Gleichung (1) verglichen.

$$x = \left(\frac{n_c - n_t}{N} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dabei ist

- x die Vermeidung, als Prozentwert;
- n_c die Anzahl an Würmern im Kontrollboden (entweder je Gefäß oder im Kontrollboden aller Wiederholungen);
- n_t die Anzahl an Würmern im Prüfboden (entweder je Gefäß oder im Prüfboden aller Wiederholungen);
- N die Gesamtanzahl an Würmern (üblicherweise 10, entweder je Gefäß oder im Kontrollboden aller Wiederholungen).

Unter Verwendung dieser Angaben kann jede mittlere effektive Konzentration, EC_x , für eine festgelegte prozentuale Wirkung (EC_{50} oder EC_{20}) und ihre angegliederten Vertrauensgrenzen berechnet werden.

Zur statistischen Analyse von ökotoxikologischen Daten siehe [15].

Ein Vergleich von Ergebnissen aus Zweikammer- oder Sechskammerprüfgefäßen ist in Anhang G angegeben.

Wenn sich Kontroll- und Prüfboden in mehr wichtigen Eigenschaften als lediglich den Verunreinigungen unterscheiden, sind statistische Berechnungen nicht geeignet. In diesem Fall wird die Anwendung eines festen Schwellenwertes an Stelle einer statistisch signifikanten Differenz zwischen der Anzahl der Würmer im Prüf- und Kontrollboden empfohlen. Prüfböden mit weniger als 20 % der Gesamtanzahl an Würmern werden als „Boden mit eingeschränkter Lebensraumfunktion“ eingestuft.

Angaben zum Einfluss der Bodeneigenschaften auf das Vermeidungsverhalten befinden sich in Anhang H.

Wenn eine Anziehung von > 80 % durch den Prüfboden beobachtet wird, kann die Gegenwart chemischer Substanzen nicht ausgeschlossen werden. Das Ergebnis sollte ebenfalls als eine Wirkung bewertet werden.

9 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens die folgenden Informationen enthalten:

- a) einen Verweis auf diesen Teil von ISO 17512;
- b) die in Übereinstimmung mit Abschnitt 8 angegebenen Ergebnisse;
- c) eine genaue Beschreibung der Eigenschaften des Prüf- und des Kontrollbodens;
- d) bei Prüfung von Chemikalien eine genaue Beschreibung der Prüfsubstanz und des Anwendungs- oder Beimengungsverfahrens;
- e) vollständige Beschreibung des eingesetzten biologischen Materials (Arten, Gewichtsspanne, Anzuchtbedingungen, Lieferant);
- f) vollständige Beschreibung der Versuchsanordnung und der Durchführung;
- g) Beschreibung der Prüfbedingungen, einschließlich Feuchtegehalt und pH-Wert;
- h) Anzahl der adulten Würmer im Prüfboden und im Kontrollboden zu Beginn (nur beim Sechskammerprüfgefäß relevant) und am Ende der Prüfung;
- i) Sterberate der adulten Würmer;
- j) Beschreibung der beobachteten offensichtlichen morphologischen Symptome beim Prüforganismus;
- k) Bewertung hinsichtlich der eingeschränkten beziehungsweise nicht eingeschränkten Lebensraumfunktion oder der statistisch berechneten Werte (geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist, Konzentration, bei der keine Wirkung zu beobachten ist, und/oder EC_{50}), einschließlich des 95 %-Vertrauensbereichs, Berechnungsverfahren, aufgetragene Kurve für die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung;
- l) Diskussion der Ergebnisse;
- m) alle nicht in dieser Norm festgelegten oder wahlweise durchzuführenden Einzelheiten sowie jegliche Auswirkungen, die die Ergebnisse beeinflusst haben können.

Anhang A (informativ)

Prüfgefäße

A.1 Zweikammerprüfgefäß

Runde oder rechteckige Behälter (Glas oder Kunststoff) mit einem Fassungsvermögen von 1 l bis 2 l und einer Querschnittsfläche von ungefähr 0,02 m².



Bild A.1 — Beispiel für ein Zweikammerprüfgefäß

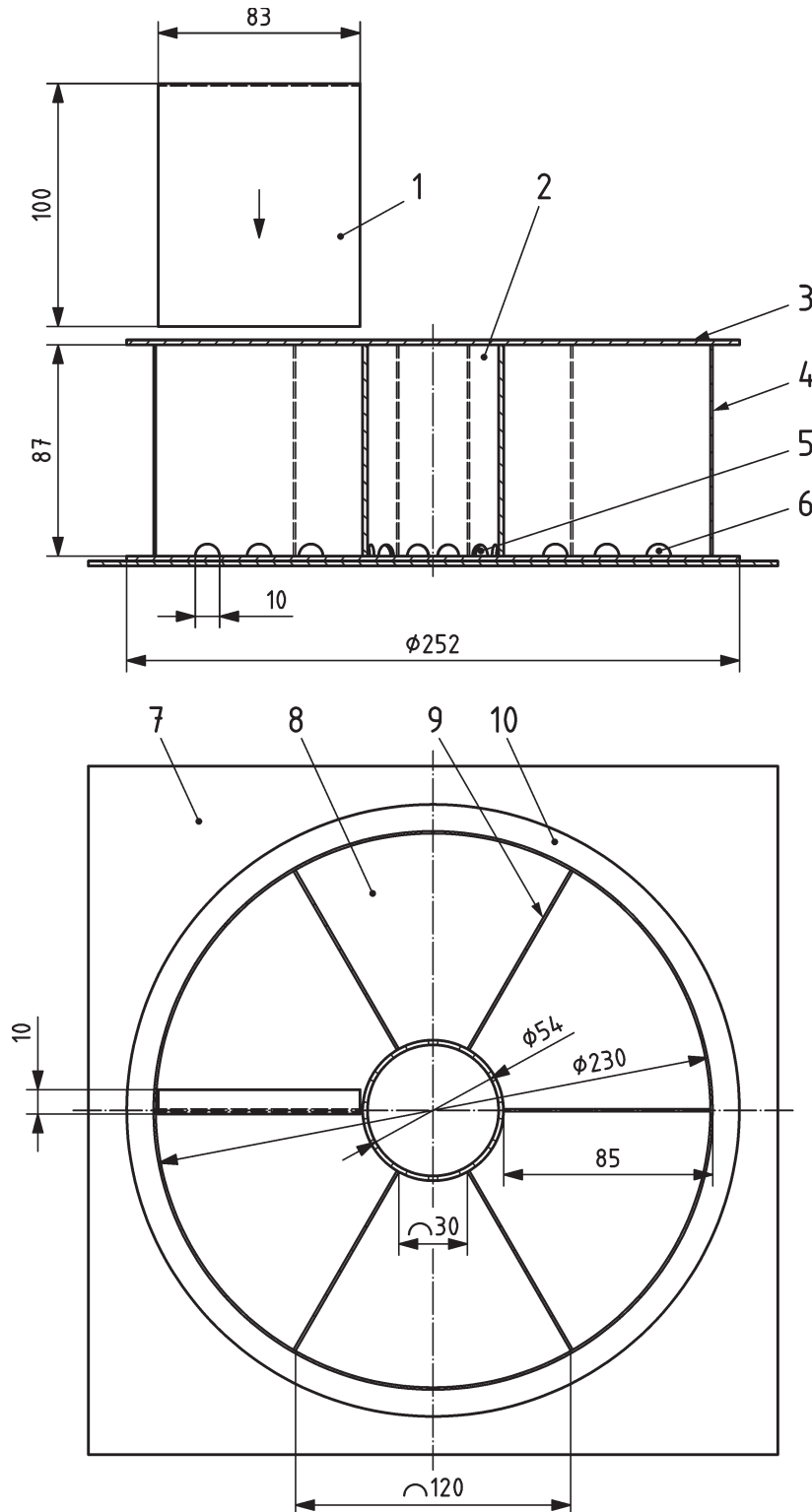
A.2 Sechskammerprüfgefäß

Rundes Gefäß mit einer mittigen, nicht mit Boden gefüllten Kammer. Die Gestaltung der Prüfeinheit ist kreisförmig mit einem Außendurchmesser von 230 mm. Jede Prüfeinheit ist in sechs tortenstückförmige Kammern unterteilt, die eine zentrale runde Kammer (Durchmesser von 54 mm) umschließen. Eine Reihe von Bohrungen mit einem Durchmesser von 10 mm (zwei je Kammer) verbindet die zentrale Kammer mit jeder der sechs Kammern. Die sechs Kammern sind ebenfalls mit ihren Nachbarkammern durch drei Bohrungen entlang der Unterkante der Trennwände, die die Kammern gegenseitig abtrennen, verbunden. Die Prüfeinheit besteht entweder aus hochqualitativem nichtrostendem Stahl (1 mm bis 4 mm dick) für die Anwendung bei Böden, die mit organischen Verbindungen verunreinigt sind, oder aus Kunststoff (5 mm bis 6 mm dick) für die Anwendung bei Böden, die mit Metallverbindungen verunreinigt sind.



Bild A.2 — Beispiel für ein Sechskammerprüfgefäß

Maße in Millimeter



Legende

- | | | | |
|---|--|---|--|
| 1 | entfernbarer Trennvorrichtung (sechs je Prüfeinheit) | 6 | Bohrungen zwischen den Kammern |
| 2 | innere Kammer ohne Boden, in die die Würmer zu Beginn der Prüfung gesetzt werden | 7 | hölzerne Auflageplatte |
| 3 | Deckel | 8 | tortenstückförmig geschnittene Prüfkammern |