

DIN EN ISO 18763

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2020-01-29

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Bestimmung der toxischen Wirkung von Schadstoffen auf die Keimung und
das frühe Wachstum höherer Pflanzen (ISO 18763:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 18763:2019**

Soil quality –

Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants (ISO 18763:2016);

German and English version prEN ISO 18763:2019

Qualité du sol –

Détermination des effets toxiques des polluants sur la germination et la croissance primaire des plantes supérieures (ISO 18763:2016);

Version allemande et anglaise prEN ISO 18763:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-11-29 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 60 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 18763:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 18763:2019 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/nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 10993-10:2010	siehe	DIN EN ISO 10993-10:2010-12
ISO 11074:2015	siehe	DIN EN ISO 11074:2015-11
ISO 11269-1	siehe	DIN EN ISO 11269-1
ISO 11269-2	siehe	DIN EN ISO 11269-2
ISO 11274	siehe	DIN EN ISO 11274
ISO 17512-2	siehe	DIN ISO 17512-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10993-10:2010-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Hautsensibilisierung (ISO 10993-10:2010); Deutsche Fassung EN ISO 10993-10:2010*

DIN EN ISO 11074:2015-11, *Bodenbeschaffenheit — Wörterbuch (ISO 11074:2015); Dreisprachige Fassung EN ISO 11074:2015*

DIN EN ISO 11269-1, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung*

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 EN ISO 11274, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 17512-2, *Bodenbeschaffenheit — Vermeidungsprüfung zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten — Teil 2: Prüfung mit Collembolen*

— Leerseite —

Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Schadstoffen auf die Keimung und das frühe Wachstum höherer Pflanzen (ISO 18763:2016)

Qualité du sol — Détermination des effets toxiques des polluants sur la germination et la croissance primaire des plantes supérieures (ISO 18763:2016)

Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants (ISO 18763:2016)

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	8
5 Reagenzien, Prüforganismen und Medien	9
6 Prüfeinrichtung und Materialien	10
7 Behandlung und Vorbereitung von Proben	11
7.1 Bodenproben	11
7.1.1 Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens	11
7.1.2 Alternatives Verfahren zur Bestimmung des in die Prüfplatten zur Hydratation von luftgetrockneten Böden hinzuzufügenden Wasservolumens	11
8 Durchführung	12
8.1 Prüfverfahren zur Bestimmung der Wirkungen von verunreinigten Böden	12
8.1.1 Zugabe von Kontrollboden und Prüfboden zu den Prüfplatten und Hydratation der Böden	12
8.1.2 Einbringen der Samen	13
8.1.3 Inkubation der Prüfplatten	13
8.1.4 Bildaufnahme	13
9 Messung	14
9.1 Zählen der Anzahl der gekeimten Samen	14
9.2 Messung der Wurzellängen der gekeimten Samen	14
9.2.1 Messung aller Wurzellängen in jeder Prüfplatte	14
9.2.2 Messung der Länge der längsten Wurzel in jeder Prüfplatte	15
10 Berechnung der prozentualen Hemmung	16
11 Referenzsubstanz	16
12 Präzision	17
13 Gültigkeitskriterien	17
14 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Anwendung der Prüfung auf Phytotoxizität in transparenten Prüfplatten auf natürliche und künstliche Böden und Bodenmaterialien, mit unterschiedlichen Pflanzenarten	19
Anhang B (informativ) Zusammenbau von Prüfplatten für die Phytotoxizitätsprüfung	21
B.1 Allgemeines	21
B.2 Benötigte Materialien	21
B.3 Verfahren des Zusammenbaus der Prüfplatte	21
Anhang C (informativ) Internationale Ringversuche zur Phytotoxizitätsprüfung	22
Literaturhinweise	28

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 18763:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 18763:2019 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 18763:2016 wurde von CEN als prEN ISO 18763:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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 methods*, erarbeitet.

Einleitung

Die ökotoxikologische Prüfung von Prüfböden oder von auf dem Boden zu beseitigenden Abfällen ist erforderlich, um das aus Bodenverunreinigung oder der Beseitigung von Abfällen, wie z. B. Klärschlamm auf Ackerland, resultierende potentielle Risiko für die Umwelt zu beurteilen. Es ist auch erforderlich, die Bodenbeschaffenheit nach der Sanierung von Industriegeländen zu überwachen. Daher wurde eine sehr praktische und schnelle Keim- und Wachstumsprüfung entwickelt, die auf der Keimung von Samen und dem Wachstum von Sämlingen unter kontrollierten Umgebungsbedingungen beruht.

Die Untersuchung, die keine Vorbehandlung der Samen erfordert, wird in „transparenten Prüfplatten“ durchgeführt, die vertikal inkubiert werden, damit die Wurzeln und die Sprosse der gekeimten Samen gesehen werden können. Nach einer Einwirkungsdauer von 72 h wird ein Bild der transparenten Prüfplatten aufgenommen und kann „durch Bildanalyse“ in Bezug auf mehrere Endpunkte analysiert werden, wie z. B. den Prozentsatz der Samenkeimung und Länge der Wurzeln und Sprosse. Um der Variabilität der Empfindlichkeit der Pflanzenarten Rechnung zu tragen, werden die Untersuchungen mit den Samen von drei Pflanzenarten durchgeführt: eine einkeimblättrige (Monokotyle) (*Sorghum saccharatum*) und zwei zweikeimblättrige (Dikotyle) (*Lepidium sativum* und *Sinapis alba*).

Ein Hauptvorteil dieser Prüfung besteht darin, dass nach dem Aufnehmen und Speichern der Bilder der Prüfplatten die Messungen durch Bildanalyse auf einen geeigneten Zeitpunkt verschoben werden können.

Als Negativkontrollen können Referenz- oder Standardböden verwendet werden, wie zum Beispiel künstlicher ISO-Standardboden nach ISO 11269-1 und ISO 11269-2.

Handelsübliche Samen mit einer Haltbarkeit von mehr als einem Jahr ermöglichen die Anwendung dieser Prüfung zu jeder Jahreszeit.

In zwei internationalen Ringversuchen wurde nachgewiesen, dass die Prüfung zu guten Ergebnissen führt.

In einer beträchtlichen Anzahl von Studien werden Daten zur Anwendung dieser Prüfung auf verschiedene Arten von Böden und Bodenmaterialien mit verschiedenen Pflanzenarten berichtet.

1 Anwendungsbereich

Die vorliegende Internationale Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von Boden und bodenähnlichen Materialien auf die Samenkeimung und das frühe Wachstum höherer Pflanzen. Diese Endpunkte sind nützliche Indikatoren für die Beurteilung der Qualität eines Bodens als Lebensraum für Organismen. Diese Internationale Norm ist auf alle Böden anwendbar, in denen Bodenorganismen aktiv sind, und darf zur Bewertung von Folgendem angewendet werden:

- der Wirkungen auf Pflanzen aufgrund der Toxizität von festen oder flüssigen Chemikalien, die den Boden oder Materialien (Kompost, Schlamm, Abfälle) verunreinigen, und Chemikalien, die dem Boden zugegeben werden;
- der Änderungen der Wirkung des Bodens auf Pflanzen nach Sanierungsmaßnahmen.

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 11269-1, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth*

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

ISO/TS 20281, *Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

künstlicher Boden

Gemisch aus Sand, Kaolinit, Torf und Calciumcarbonat, hergestellt nach ISO 11269-1 und ISO 11269-2

3.2

Kontrollboden

Referenz- oder Standardboden, der als Kontrolle und als Medium zur Herstellung von Verdünnungsreihen mit den Prüfböden oder einer Referenzsubstanz verwendet wird

3.3

Referenzboden

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

3.4

Standardboden

im Feld entnommener Boden oder künstlicher Boden, dessen wesentliche Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Struktur, Gehalt an organischer Substanz) innerhalb eines bekannten Bereichs liegen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Eigenschaften des Standardbodens können sich von denen des Prüfbodens unterscheiden.

BEISPIEL Euro-Böden [1], künstlicher Boden [2], LUFA-Boden¹.

3.5

Prüfboden

entweder ein natürlicher oder ein künstlicher sauberer (schadstofffreier) Boden, der mit der Prüfsubstanz angereichert wurde, oder ein verunreinigter natürlicher Boden (ein Standortboden) [5]

3.6

Saataufwurf

Erscheinen eines sichtbaren Keimlings oberhalb der Oberfläche des Abdeckmaterials

[QUELLE: ISO 17126:2005, 3.1, modifiziert]

3.7

Keimung

Erscheinen einer Wurzel mit einer Länge von mindestens 1 mm

3.8

Reinwasser

Wasserqualität, die zum Beispiel durch einfache Destillation, durch Entionisierung, durch Ultrafiltration oder durch Umkehrosmose erzeugt wird [5].

3.9

Wurzellänge

Länge der Wurzel vom Samen bis zur Wurzelspitze

3.10

Sprosslänge

Länge des nach oben wachsenden Teils, vom Samen bis zur Spitze

3.11

Wassersättigung

Wassergehalt, den ein Boden in ungestörter Lagerung maximal gegen die Schwerkraft speichern kann, konventionell angegeben als Wassergehalt zwei bis drei Tage nach voller Wassersättigung

[QUELLE: ISO 11074:2015, 2.1.5 Feldkapazität, modifiziert]

3.12

wassergesättigter Boden

Boden, der seinen maximalen Wassergehalt erreicht hat

1 Euro-Böden, künstlicher Boden und LUFA-Boden sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.

3.13

Wasserrückhaltevermögen

Masse des Wassers, das aus dem mit Wasser gesättigten Boden verdunstet, wenn der Boden bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet wird, dividiert durch die Trockenmasse des Bodens [7]

3.14

Negativkontrolle

beliebige(s) gut beschriebene(s) Material oder Substanz, das/die, wenn nach einem bestimmten Verfahren geprüft, die Eignung des Verfahrens zur Erzielung einer reproduzierbaren, in geeignetem Maße negativen, nicht reaktiven oder minimalen Reaktion im Prüfsystem nachweist

[QUELLE: ISO 10993-10:2010, 3.12, modifiziert]

3.15

prozentuale Wirkung

prozentuale Abnahme der Samenkeimung und des Wachstums der Pflanzenwurzeln und/oder -sprosse im Prüfboden im Vergleich zum Kontrollboden

4 Kurzbeschreibung

Dieses Verfahren vergleicht die Keimung der Samen und das frühe Wachstum von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen in einem Prüfboden und/oder einer Reihe von Gemischen mit einem Kontrollboden. Das vorliegende Verfahren darf auch zur Prüfung von Kompost, Schlamm oder Abfällen angewendet werden.

Die Samen von einer einkeimblättrigen Pflanze, wie z. B. *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, und zwei zweikeimblättrigen Pflanzen, wie z. B. *Lepidium sativum* L. und *Sinapis alba* L., werden unter kontrollierten Bedingungen dem Prüfmaterial ausgesetzt. Nach (72 ± 1) h wird die Anzahl der gekeimten Samen aufgezeichnet und die Länge der Wurzeln der Prüfpflanzen im Prüfboden und im Kontrollboden gemessen.

Wenn unterschiedliche Samenarten verwendet werden, darf die Länge der Inkubationsdauer in Abhängigkeit von der Keimzeit der Samen und der Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzeln angepasst werden.

Für die Prüfung werden spezifische flache und schmale transparente Prüfplatten (6.3) verwendet, die aus zwei Kammern bestehen, von denen die untere hydratisierten Boden enthält.

Samen der ausgewählten Prüfpflanzen werden in gleichem Abstand in der Nähe des Mittelstegs der Prüfplatte (6.3) auf einem auf der Oberseite des hydratisierten Bodens befindlichen schwarzen Filtrierpapier (6.5) angeordnet.

Nach dem Schließen der Prüfplatten (6.3) mit dem zugehörigen transparenten Deckel werden die Prüfplatten vertikal in einem Halter (6.4) angeordnet und (72 ± 1) h bei (25 ± 1) °C inkubiert.

Am Ende der Inkubationsdauer kann die Länge jeder Wurzel (und jedes Sprosses, falls gewünscht) direkt mit einem Lineal gemessen und aufgezeichnet werden.

Alternativ wird ein „digitales“ Bild der Prüfplatten (6.3) mit den gekeimten Pflanzen (entweder mit einer Digitalkamera, einer Webcam (Netzkamera) oder einem Flachbett-Papierscanner) zur Speicherung in einer Computerdatei aufgenommen. Die anschließenden Messungen der Wurzellänge werden mittels Bildanalyse durchgeführt. Die Analysen zur Keimung und zum Wurzelwachstum können dann sofort durchgeführt oder auf einen geeigneten Zeitpunkt verschoben werden.

ANMERKUNG Die gleiche Verfahrensweise kann auch bei der Messung der Sprosshöhe, falls gewünscht, angewendet werden. Die Berechnung des Verhältnisses Spross-/Wurzellänge ist ein möglicher zusätzlicher Wirkungsparameter.

5 Reagenzien, Prüforganismen und Medien

5.1 Wasser.

Reinwasser mit einer Leitfähigkeit unter 10 µS/cm.

5.2 Prüforganismen.

Die Prüforganismen sind Samen von einer einkeimblättrigen Pflanze, wie z. B. *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, und zwei zweikeimblättrigen Pflanzen, wie z. B. *Lepidium sativum* L. und *Sinapis alba* L.

Untersuchungen wurden nicht nur mit den drei in 5.2 angegebenen Pflanzenarten durchgeführt, sondern auch mit anderen einkeimblättrigen und zweikeimblättrigen Pflanzenarten. Eine Zusammenführung dieser veröffentlichten Studien ist in Anhang A angeführt.

Mit Insektiziden und/oder Fungiziden gebeizte Samen sollten vermieden werden.

5.3 Kontrollboden.

Als Kontrollboden können entweder Referenz- oder Standardböden verwendet werden, wenn in diesen Böden ein ungehindertes Wachstum der Prüfpflanzen erwartet werden kann.

Beim Vergleich des Wurzellängenwachstums in Böden von bekannter und unbekannter Beschaffenheit sollten der Kontrollboden und der zu untersuchende Boden derselben Gefügekategorie angehören und hinsichtlich aller anderen Aspekte, mit Ausnahme des Vorliegens der zu untersuchenden Chemikalien oder Verunreinigungen, so ähnlich wie praktisch möglich sein. Tatsächlich können signifikante Unterschiede in den Bodenkennwerten, mit Ausnahme des Vorliegens von Verunreinigungen, zu Unterschieden in der Wurzellänge und somit zu falsch positiven Prüfergebnissen führen.

Alternativ darf künstlicher Boden nach ISO 11269-1 und ISO 11269-2 verwendet werden. Das als „künstlicher Boden“ bezeichnete Substrat hat folgende Zusammensetzung:

	Prozentualer Anteil bezogen auf die Trockenmasse
fein gemahlener Sphagnum-Torf ohne sichtbare Pflanzenreste	10 %
Kaolin, der mindestens 30 % Kaolinit enthält	20 %
Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 0,05 mm bis 0,2 mm aufweist)	69 %

ANMERKUNG Wie in ISO 11269-1 angegeben, haben sich 5 % Torf zum Aufrechterhalten der gewünschten Struktur des künstlichen Bodens als hinreichend erwiesen (bei einer entsprechenden Erhöhung des prozentualen Anteils von Sand auf 75 %). Ein geringerer prozentualer Anteil von Kaolin (10 % anstelle von 20 %) liegt zudem sehr nahe am Tongehalt von LUFA 2.2 und ist somit repräsentativer für einen natürlichen Boden. Deshalb wird die folgende Zusammensetzung des künstlichen Bodens empfohlen: 5 % Torf, 10 % Kaolin und 85 % Sand.

Um einen pH-Wert auf $6,0 \pm 0,5$ einzustellen, sind etwa 0,3 % bis 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, analysenrein) notwendig.

6 Prüfeinrichtung und Materialien

6.1 Inkubator oder Raum mit Temperaturregelung, geeignet zum Aufrechterhalten der festgelegten Bedingungen bei $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

6.2 Digitalkamera, Webcam oder Flachbett-Papierscanner, um Bilder der Prüfplatten mit den gekeimten Samen zur Speicherung in einer Computerdatei aufzunehmen.

6.3 Prüfplatten, transparente Platten aus Polyvinylchlorid (PVC).

Die Prüfplatten bestehen aus einem Unterteil, das durch einen Mittelsteg in einen oberen Teil und einen unteren Teil getrennt ist, und einem flachen Deckel. Prüfplatten können mit Hilfe einer transparenten PVC-Platte und kleinen rechteckigen Stäben „handgefertigt“ werden, wie in Anhang B beschrieben.

Alternativ können handelsübliche² Prüfplatten verwendet werden. Der untere Teil dieser Prüfplatten ist dafür vorgesehen, etwa 90 cm³ Prüfboden aufzunehmen. Die letzteren Prüfplatten haben auf beiden Teilen an der Seite kleine rechteckige Vertiefungen, um die Platten durch ein einzigartiges Klick-System dicht zu verschließen. Die Prüfplatten müssen mit einem Etikett versehen werden, um die Besonderheiten jeder Prüfplatte (Bodenart, Samenart, Nummer der Parallelprobe) aufzuzeichnen.

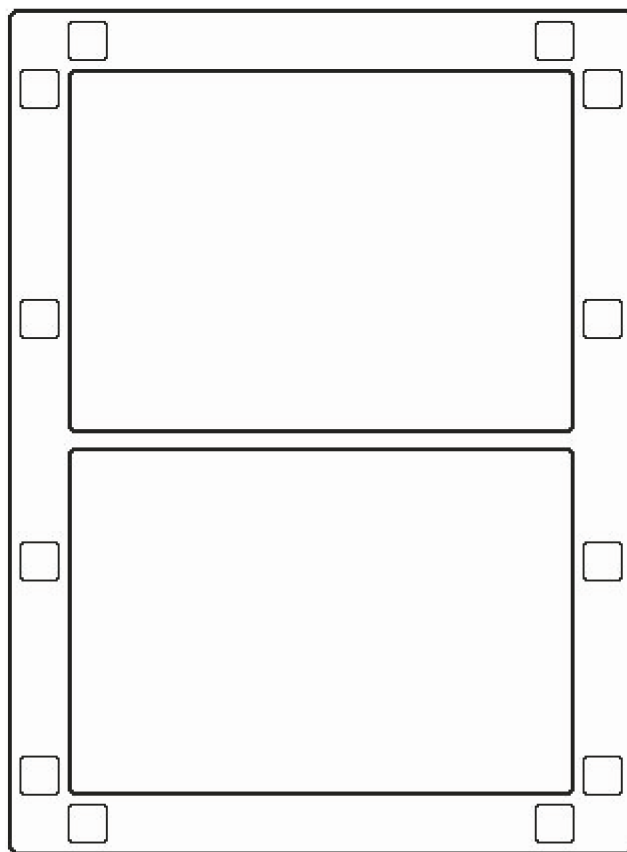


Bild 1 — Prüfplatte mit Vertiefungen auf der Seite zum dichten Verschließen der Platte

² Die von MicroBioTests Inc. Mariakerke-Gent, Belgien, gelieferten Prüfplatten sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.

6.4 Prüfplattenhalter, Halter aus Karton für die vertikale Inkubation von jeweils sechs Prüfplatten (6.3).

6.5 Schwarze Filtrierpapiere, rechteckige schwarze Filtrierpapiere hoher Reinheit (z. B. 85 g/m², 0,17 mm dick, Filtriergeschwindigkeit 45 s), die auf den unteren Teil der Prüfplatte passen und auf die Oberseite des Boden in der unteren Kammer der Prüfplatten gelegt werden (6.3).

6.6 Mikrosieb-Zylinder, kleiner Kunststoffzylinder, der am Boden mit einem Nylongewebe ausgestattet ist, zur Bestimmung des dem Prüfboden zuzugebenden Wassers.

6.7 Mikropipette mit breiter Öffnung, Mikropipette aus Kunststoff, die mit dem Mikrosieb-Zylinder (6.6) zur Bestimmung des dem Prüfboden zuzugebenden Wassers zu verwenden ist.

6.8 Sieb, Sieb mit einer Maschenweite von 2 mm zum Sieben des Prüfbodens vor der Verwendung für die Untersuchungen.

6.9 Dünner Spatel, Handwerkzeug mit einer dünnen Klinge, das zum Mischen des Prüfbodens mit Wasser verwendet wird.

6.10 Flacher Spatel, Handwerkzeug mit einer breiten, flachen Klinge, das zum Verteilen und Ebnen des Prüfbodens in der unteren Kammer der Prüfplatten (6.3) verwendet wird.

6.11 Pinzette, kleines zangenähnliches Werkzeug für die Handhabung der Samen.

7 Behandlung und Vorbereitung von Proben

7.1 Bodenproben

Die Untersuchungen werden mit wassergesättigten Böden zu Beginn der Prüfungen durchgeführt.

7.1.1 Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens

Der wassergesättigte Boden kann durch Hinzufügen des geeigneten Volumens an Reinwasser zur Bodenmasse erhalten werden, wobei das Wasserrückhaltevermögen bestimmt wird.

7.1.2 Alternatives Verfahren zur Bestimmung des in die Prüfplatten zur Hydratation von luftgetrockneten Böden hinzuzufügenden Wasservolumens

Ein einfaches und schnelles alternatives Verfahren kann zur Bestimmung des zu luftgetrockneten Böden in den Prüfplatten (6.3) hinzuzufügenden Wasservolumens angewendet werden.

Für den in 5.3 empfohlenen künstlichen Boden wurde die Menge an Wasser, die zur Hydratation hinzugefügt werden musste, experimentell bestimmt. Auf der Grundlage eines Verhältnisses Wasser/Boden (auf einer Volumen:Volumen-Basis) von 0,39 müssen 35 ml Reinwasser zu den 90 cm³ Kontrollboden in der Prüfplatte (6.3) hinzugefügt werden.

Für andere Kontrollböden muss die Menge an Wasser, die zur Hydratation hinzugefügt werden muss, nach dem im nächsten Absatz für Proben von Prüfböden angeführten Verfahren experimentell bestimmt werden.

Proben von Prüfböden müssen zuerst luftgetrocknet werden, dann wird der trockene Boden durch ein Sieb (6.8) gesiebt, um das gesamte grobe Material zu entfernen.

ANMERKUNG Die Lufttrocknung ist nur an einer getrennten Bodenprobe zur anschließenden Bestimmung des den Prüfplatten zuzugebenden Wasservolumens erforderlich.

50 ml Reinwasser und 90 cm³ Prüfboden werden in einem Becherglas mit Hilfe eines dünnen Spatels (6.9) gründlich vermischt. Nach 1 min bis 2 min erscheinen zwei Schichten: der hydratisierte Boden und eine Wasserschicht darüber.

Der Mikrosieb-Zylinder (6.6) wird senkrecht in das Becherglas bis zur Oberfläche des hydratisierten Bodens abgesenkt und dann etwas weiter nach unten, so dass er beginnt, sich mit Überstand zu füllen.

Mit der Mikropipette mit breiter Öffnung (6.7) wird das Wasser im Mikrosieb abgesaugt und in einen Messzylinder überführt.

Der Mikrosieb-Zylinder (6.6) wird erneut in das Becherglas eingebracht und etwas weiter nach unten gedrückt, damit er zusätzliches Wasser aus dem Boden aufnimmt. Das rückgewonnene Wasser wird erneut in den Messzylinder überführt und die vorherigen Handhabungen werden wiederholt, bis kein Wasser mehr aus dem Boden austritt.

Es wird berechnet, wie viel Wasser für eine vollständige Hydratation des Prüfbodens benötigt wurde. Dieses Volumen (V_{sat}) ist das Volumen an Wasser, das ursprünglich zum Boden hinzugefügt wurde ($= 50 \text{ ml}$), minus das Volumen des überstehenden Wassers (S), das im Messzylinder zurückgewonnen wurde, ($V_{\text{sat}} = 50 - S$).

8 Durchführung

Die nachstehend beschriebene Verfahrensweise ist für die Verwendung von 90 cm³ Boden in den Prüfplatten (6.3) vorgesehen.

Bei der Beurteilung der Dosis-Wirkungs-Beziehung an einer unbekannten festen Probe muss eine vollständige Prüfung durchgeführt werden, die eine Reihe von Gemischen des Kontrollbodens mit der Probe (z. B. Kompost, Schlamm, Abfälle) umfasst. Die Verdünnungen müssen innerhalb einer geometrischen Reihe mit einem Trennquotienten von höchstens 2,0 hergestellt werden (siehe ISO 11269-1). In Übereinstimmung mit dem gewählten Verdünnungsbereich wird der Prüfboden gründlich mit dem Referenzboden oder dem Standardboden gemischt (entweder mit der Hand oder mit einem Handmischer). Die Homogenität des Gemisches wird visuell geprüft. Für alle sich ergebenden Verdünnungen muss das den Prüfplatten (6.3) zuzugebende Volumen an Wasser experimentell bestimmt werden (7.1.2).

8.1 Prüfverfahren zur Bestimmung der Wirkungen von verunreinigten Böden

8.1.1 Zugabe von Kontrollboden und Prüfboden zu den Prüfplatten und Hydratation der Böden

8.1.1.1 Kontrollboden

Wenn der künstliche Boden (5.3) als Kontrolle verwendet wird, werden 90 cm³ Kontrollboden (5.3) in die untere Kammer einer Prüfplatte (6.3) gegeben, dann werden langsam 35 ml Reinwasser über die gesamte Oberfläche des Kontrollbodens in der Prüfplatte getropft.

Wird ein anderer Kontrollboden verwendet, wird die experimentell bestimmte Menge an Wasser (7.1.2) hinzugefügt.

Es wird 1 min bis 2 min gewartet, damit das Wasser den Boden vollständig hydratisiert.

Mit dem Spatel mit flacher Klinge (6.10) wird der nasse Boden gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der unteren Kammer der Prüfplatte (6.3) geebnet, um eine Schicht von gleichmäßiger Tiefe zu erhalten.

Die vorherigen Arbeitsabläufe werden für alle Prüfplatten (6.3) mit Negativkontrollen wiederholt (= neun Prüfplatten).

8.1.1.2 Prüfboden

90 cm³ gesiebter Prüfboden werden in die untere Kammer einer Prüfplatte (6.3) gegeben, dann wird der Prüfboden wie vorstehend für den Kontrollboden angeführt durch Tropfen eines Volumens an Reinwasser gleich V_{sat} (7.1.2) auf die Oberfläche des Bodens in der Prüfplatte hydratisiert und mit dem Spatel mit flacher Klinge (6.10) geebnet.

Die vorherigen Arbeitsabläufe werden für alle anderen Platten mit Prüfboden wiederholt (= neun Prüfplatten).

ANMERKUNG An alternatives Verfahren zur wiederholten Messung eines Volumens von 90 cm³ Boden in einem Messgefäß besteht darin, die Masse des Prüfbodens zu bestimmen, die 90 cm³ entspricht, und derartige Massen für die Überführung in die entsprechenden Prüfplatten (6.3) vorzubereiten.

8.1.2 Einbringen der Samen

Auf den hydratisierten Boden wird in allen Prüfplatten (6.3) ein schwarzes Filtrierpapier (6.5) gelegt, um das Einschließen von Luftblasen unter dem Filter zu vermeiden, und 1 min bis 2 min gewartet, bis das Filter vollständig nass ist.

Die Untersuchung wird an drei Parallelproben mit drei verschiedenen Samen durchgeführt. Das bedeutet, dass drei Prüfplatten (6.3) mit Kontrollboden und drei Prüfplatten mit Prüfboden mit jeder Samenart „beimpft“ werden müssen.

Mit Hilfe einer Pinzette (6.11) werden 10 Samen von derselben Prüfplanze genommen und in gleichem Abstand voneinander und etwa 1 cm vom Mittelsteg der Prüfplatte (6.3) entfernt in einer Reihe auf das schwarze Filterpapier (6.5) gelegt.

Das Deckelteil der Prüfplatte wird auf das Unterteil gelegt, die Prüfplatte wird dicht verschlossen und beschriftet, indem die Besonderheiten der Prüfung (Bodenart, Samenart, Nummer der Parallelprobe) angegeben werden.

Die vorherigen Arbeitsabläufe werden für alle Samen für die drei Kontroll-Prüfplatten und die drei Parallelproben mit Prüfboden wiederholt.

8.1.3 Inkubation der Prüfplatten

Die sechs Prüfplatten (6.3), die mit den gleichen Samen „beimpft“ sind, (drei mit Prüfboden und drei mit Kontrollboden) werden vertikal in einem Prüfplattenhalter (6.4) angeordnet.

Dieser Arbeitsablauf wird für die anderen beiden Samen wiederholt.

Die drei Prüfplattenhalter (6.4) mit den entsprechenden Prüfplatten (6.3) werden im Inkubator (6.1) angeordnet und (72 ± 1) h bei (25 ± 1) °C inkubiert.

ANMERKUNG Licht scheint während der kurzen Inkubationszeit (drei Tage) keinen Einfluss auf die Keimung der Samen oder das Wachstum der Wurzeln zu haben. Es wird daher empfohlen, während der Prüfdauer keine Beleuchtung im Inkubator vorzusehen.

8.1.4 Bildaufnahme

Das Bild der Prüfplatten am Ende der Einwirkungsdauer kann entweder mit einer Webcam, einer Digitalkamera oder einem Flachbett-Papierscanner aufgenommen werden. Das Bild muss in eine Datei auf einem Computer übertragen werden.

Für die nachfolgenden Analysen kann eine beliebige Art von Bildanalyseprogramm angewendet werden, vorausgesetzt, es ermöglicht Längenmessungen.

ANMERKUNG Ein bequemes und praktisches Bildanalyseprogramm ist „Image J“, das direkt aus dem Internet heruntergeladen werden kann (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

9 Messung

Sämtliche Messungen sollten innerhalb von (60 ± 10) min nach dem Ende der Einwirkungsdauer erfolgen oder sie können durch Bildaufnahme (8.1.4) der Prüfplatten (6.3) auf einen geeigneten Zeitpunkt verschoben werden.

9.1 Zählen der Anzahl der gekeimten Samen

Die Anzahl der gekeimten Samen, N_s , in den Prüfplatten (6.3) wird gezählt und der Zahlenwert wird im Ergebnisblatt „Einzeldaten“ eingetragen.

9.2 Messung der Wurzellängen der gekeimten Samen

9.2.1 Messung aller Wurzellängen in jeder Prüfplatte

9.2.1.1 Verfahren für die direkte visuelle Längenmessung

Ein gekeimter Samen wird auf ein schwarzes Blatt Papier überführt.

Mit Hilfe der Pinzette (6.11) wird die Wurzel lang gezogen und deren Länge LR wird mit einem Lineal auf einen Millimeter gemessen. Die Zahlenwerte für alle Wurzeln werden im Ergebnisblatt „Einzeldaten“ eingetragen.

Die Verfahrensweise wird für alle Samen einer Prüfplatte (6.3) und für alle Prüfplatten wiederholt.

Die gleiche Verfahrensweise darf zur Messung der Sprosshöhe angewendet werden; in diesem Fall kann das Verhältnis Spross-/Wurzellänge berechnet werden.

9.2.1.2 Verfahren zur Bildanalyse der Längenmessung

Das Bildanalyseprogramm, das die Durchführung von Längenmessungen ermöglicht, wird geöffnet.

Die Datei mit den gespeicherten Bildern der Prüfplatten (6.3) wird geöffnet und eines der gespeicherten Bilder wird ausgewählt.

Die Messeinheit für die Längenmessung der Wurzeln (in Millimeter) wird nach den Anweisungen des Bildanalyseprogramms kalibriert.

Die Messung der Länge LR wird an allen Wurzeln der gekeimten Samen in den Prüfplatten (6.3) durchgeführt, jede Länge LR wird im Ergebnisblatt „Einzeldaten“ eingetragen (siehe Tabelle 1).

Diese Arbeitsabläufe werden für alle Prüfplatten (6.3) wiederholt.