

DIN EN ISO 21285



ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2020-01-29

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Hemmung der Reproduktion von Raubmilben (*Hypoaspis aculeifer*) durch
Bodenverunreinigungen (ISO 21285:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21285:2019**

Soil quality –

Inhibition of reproduction of the soil mite (*Hypoaspis aculeifer*) by soil contaminants
(ISO 21285:2019);

German and English version prEN ISO 21285:2019

Qualité du sol –

Inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur (*Hypoaspis aculeifer*) par des
contaminants du sol (ISO 21285:2019);

Version allemande et anglaise prEN ISO 21285:2019

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 59 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 21285:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 21285:2019 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 Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02 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 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11267:2014	siehe	DIN EN ISO 11267:2014-07
ISO 11268-2	siehe	DIN EN ISO 11268-2
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465
ISO 17616	siehe	DIN ISO 17616

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 11267:2014-07, *Bodenbeschaffenheit — Hemmung der Reproduktion von Collembolen (Folsomia candida) durch Verunreinigungen*

DIN EN ISO 11268-2, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida/Eisenia andrei*

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

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

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

DIN ISO 17616, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung für die Auswahl und Beurteilung von Biotestverfahren zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien*

— Leerseite —

Bodenbeschaffenheit — Hemmung der Reproduktion von Raubmilben (*Hypoaspis aculeifer*) durch Bodenverunreinigungen (ISO 21285:2019)

Qualité du sol — Inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur (Hypoaspis aculeifer) par des contaminants du sol (ISO 21285:2019)

Soil quality — Inhibition of reproduction of the soil mite (Hypoaspis aculeifer) by soil contaminants (ISO 21285:2019)

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	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien und Materialien	10
5.1 Biologische Materialien	10
5.2 Prüfmischung	10
5.3 Referenzsubstanz	12
6 Geräte	12
7 Durchführung	13
7.1 Prüfaufbau	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (Vorprüfung)	13
7.1.3 Hauptprüfung	14
7.1.4 Grenzwertprüfung	14
7.2 Herstellung der Prüfmischungen	15
7.2.1 Prüfung des verunreinigten Bodens	15
7.2.2 Prüfung von dem Prüfsubstrat zugegebenen Substanzen	15
7.2.3 Vorbereitung der Kontrollgefäße	16
7.3 Zugabe des biologischen Materials	16
7.4 Prüfbedingungen und Messungen	16
7.5 Füttern der Milben	17
7.6 Bestimmung der überlebenden Prädatormilben	17
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	17
8.1 Berechnung	17
8.2 Angabe der Ergebnisse	18
9 Gültigkeit der Prüfung	18
10 Statistische Analyse	18
10.1 Allgemeines	18
10.2 Einzel-Konzentrationsprüfungen	18
10.3 Mehrfach-Konzentrationsprüfungen	19
10.3.1 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs	19
10.3.2 Hauptprüfung	19
11 Prüfbericht	20
Anhang A (informativ) Verfahren zur Haltung und Zucht von Prädatormilben	22
Anhang B (normativ) Bestimmung der Wasserhaltekapazität	24
Anhang C (informativ) Anleitung zur Einstellung des pH-Werts des künstlichen Bodens	25

Anhang D (informativ) Extraktion und Auszählen von Prädatormilben.....	26
Anhang E (informativ) Grundlegende Informationen über die Biologie von <i>Hypoaspis</i> <i>(Geolaelaps) aculeifer</i>	27
Literaturhinweise.....	28

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21285:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 21285:2019 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 21285:2019 wurde von CEN als prEN ISO 21285:2019 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 characterization*, erarbeitet.

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

Einleitung

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

Milben (Acari) sind eine weltweite und heterogene Gruppe der Arthropoden, die zur Klasse der Arachniden mit über 40 000 verzeichneten Arten gehören, unterteilt in zwei große Überordnungen (Acariformes und Parasitiformes). Aufgrund ihrer relativ geringen Größe (wenige µm bis hin zu wenigen cm) besiedeln sie besondere ökologische Nischen auf Pflanzen und in Böden [13].

Unter den bodenbewohnenden Milben wird die Rolle der Prädation beispielsweise durch *Hypoaspis* sp. (Laelapidae) sichergestellt. Da sie chemischer Verunreinigung ausgesetzt sind, gelten Milben bereits als in der umweltbezogenen Risikoanalyse von Pestiziden als nicht-Zielorganismen berücksichtigt [10]. Tatsächlich sind, unter den für die aktiven Substanzen von Pestiziden erforderlichen Daten, die Auswirkungen auf Raubmilben bereits bewertet, d. h. für den Pflanzenbewohner *Typhlodromus pyri* (Phytoseiidae) und den Bodenbewohner *Hypoaspis aculeifer* (Laelapidae) [6].

Die ersten Autoren, die *H. aculeifer* als Testorganismus in ökotoxikologische Studien [23] [17] einführten, schlugen später im Europäischen Projekt SECOFASE (Sublethal Effects of Chemicals on Fauna in the Soil Ecosystem) ein Prüfsystem mit zwei Spezies vor, darunter die Collembolen *Folsomia fimetaria* als Beutetier. Vor dem Hintergrund der Entwicklung einer ökotoxikologischen Prüfung für die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln auf nicht-Ziel-Arthropoden [5] [6], wurde des Weiteren ein Protokoll zu bodenbewohnenden Milben unter Verwendung von *H. aculeifer* vorgeschlagen. In jüngerer Vergangenheit wurde für diese Spezies ein Standard-Prüfprotokoll zur Bewertung von Chemikalien von der OECD im Jahr 2008 entwickelt und im Jahr 2016 überarbeitet. Die Ergebnisse des damit verbundenen Ringversuchs wurden von Smit *et al.*, 2012 veröffentlicht siehe [25].

Unter den Milben ist der Prädator *Hypoaspis aculeifer* die im Labor am meisten untersuchte Spezies. Es wurde festgestellt, dass der Reproduktionsendpunkt im Allgemeinen empfindlicher als Mortalität und Vermeidung ist. Im Vergleich zu anderen Boden-Mesofauna-Wirbellosen wurde festgestellt, dass Milben im Allgemeinen weniger empfindlich oder gleich empfindlich verglichen mit anderen Prüfspezies sind, in Abhängigkeit von den untersuchten Endpunkten und Chemikalien. Unter Berücksichtigung von Semi-Feldstudien wurde *H. aculeifer* als Top-Prädator verwendet, wohingegen andere Boden-Wirbellosen, vor allem Springschwänze in die Gruppe der Grasfresser eingeordnet wurden. In diesen Studien zeigten sich Milben als relativ tolerant gegenüber anthropogener Verunreinigung. Diese Angaben wurden ebenfalls von Felduntersuchungen bestätigt. Allerdings wird die Anwendbarkeit der Laborprüfverfahren zur Bewertung von Umweltproben (kontaminierte Böden, Abfälle usw.) mit Milben betont, da zum heutigen Tag eine begrenzte Anzahl von Studien verfügbar ist.

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren, das auf der Bestimmung der letalen und subletalen Wirkungen der verunreinigten Böden gegenüber adulten Prädatormilben der Art *Hypoaspis aculeifer* basiert. Diese Spezies gilt als für Prädator-Boden-Arthropoden repräsentativ. Hintergrundinformationen zur Ökologie dieser Milben und deren Verwendung in ökotoxikologischen Prüfungen sind verfügbar [14].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein chronisches Verfahren zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden und zur Bestimmung der Wirkungen von Bodenverunreinigungen und Substanzen auf die Reproduktion von *Hypoaspis aculeifer* — hauptsächlich — bei Aufnahme durch die Nahrung fest. Diese Methode ist anwendbar für Böden und Bodenmaterialien unbekannter Beschaffenheit, z. B. von verunreinigten Standorten, beaufschlagten Böden, Böden nach der Sanierung, industriellen, landwirtschaftlichen oder anderen betroffenen Standorten und Abfallmaterialien (z. B. Baggergut, kommunaler Schlamm aus einer Kläranlage, Kompostmaterial oder Stallbildung, speziell solche für eine mögliche Landdeponie). Die Reproduktion (= Anzahl der Jungendlichen) ist der gemessene Parameter des Tests. Die Prüfung gibt die Bioverfügbarkeit einer Mischung von Kontaminanten in natürlichen Böden (Böden von verunreinigten Standorten) für eine Art wieder, die eine trophische Ebene repräsentiert, die nicht von anderen ISO Standards abgedeckt ist. Die Reproduktion (= Anzahl der juvenilen Tiere) ist der in der Prüfung gemessene Parameter. Diese Prüfung soll nicht die Reproduktionsprüfung von Regenwürmern (ISO 11268-2) oder Collembolen (ISO 11267) ersetzen, da diese Spezies nicht nur zu einer anderen trophischen Gruppe, sondern auch zu einer anderen taxonomischen Gruppe (= Milben; d. h. Arachniden) als die üblicherweise verwendeten gehört.

Die Wirkungen der Substanzen werden mit einem Standardboden, vorzugsweise mit einem festgelegten künstlichen Bodensubstrat, bewertet. Bei verunreinigten Böden werden die Wirkungen im zu prüfenden Boden und in einem Kontrollboden bestimmt. Abhängig von der Zielsetzung der Untersuchung sind die Kontrolle und das zur Verdünnung verwendete Substrat (Verdünnungsreihen des verunreinigten Bodens) entweder ein mit dem zu prüfenden Boden vergleichbarer, nicht verunreinigter Boden (Referenzboden) oder ein Standardboden (z. B. künstlicher Boden).

Dieses Dokument gibt Informationen, wie dieses Verfahren zur Prüfung von Proben (Böden oder Substanzen) unter gemäßigten Bedingungen anzuwenden ist.

Dieses Dokument gilt nicht für Substanzen, deren Luft-/Boden-Verteilungskoeffizient größer eins ist oder für Substanzen mit einem Dampfdruck von über 300 Pa bei 25 °C.

ANMERKUNG Es kann nicht sichergestellt werden, dass die Prüfsubstanz während der gesamten Versuchsdauer stabil bleibt. Im Prüfverfahren wird die Persistenz der Prüfsubstanz nicht überwacht.

2 Normative Verweisungen

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

ISO 10390, Soil quality — *Determination of pH*

ISO 10694, Soil quality — *Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*

ISO 11260, Soil quality — *Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution*

ISO 11277, Soil quality — *Determination of particle size distribution in mineral soil material — Method by sieving and sedimentation*

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

ISO 18400-206, Soil quality — *Sampling — Part 206: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of biological functional and structural endpoints in the laboratory*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Verunreinigung

Substanz oder Mittel, die bzw. das im Boden als ein Ergebnis menschlicher Tätigkeit vorhanden ist

3.2

Wirkungskonzentration für eine Wirkung von x %

EC_x

Konzentration (Masseanteil) einer Probe, die x % einer Wirkung an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer gegebenen Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle verursacht

BEISPIEL Eine EC₅₀ ist eine Konzentration, die eine Wirkung auf 50 % der exponierten Population an einem Endpunkt der Prüfung über eine festgelegte Kontaktzeit verursacht.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die EC_x wird als ein Prozentwert des zu prüfenden Bodens (Trockenmasse) je Bodenmischung (Trockenmasse) angegeben. Wenn Substanzen geprüft werden, wird die EC_x als die Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des Bodens in Milligramm je Kilogramm angegeben.

3.3

Wirkungsrate

ER_x

Rate eines zu prüfenden Bodens, die x % einer Wirkung an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer gegebenen Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle verursacht

3.4

Grenzwertprüfung

Prüfung mit einer Konzentration, die jeweils aus mindestens vier Wiederholungen, dem zu prüfenden Boden ohne jegliche Verdünnung oder der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz, die in den Kontrollboden und die Kontrolle gemischt wird, besteht

3.5

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

LOEC

niedrigste Konzentration einer Prüfsubstanz, die eine statistisch signifikante Wirkung zeigt (Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$)

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung wird die LOEC als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des zu prüfenden Bodens angegeben. Alle Prüfkonzentrationen über der LOEC sollten üblicherweise eine Wirkung zeigen, die sich statistisch von der Kontrolle unterscheidet.

3.6

geringste Rate, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

LOER

niedrigste Rate eines zu prüfenden Bodens in einem Kontrollboden, bei der eine statistisch signifikante Wirkung beobachtet wird

3.7

höchste Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung

NOEC

höchste Konzentration einer Prüfsubstanz, die gleich unterhalb der LOEC (3.5) liegt, bei der keine Wirkung beobachtet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung zeigt die der NOEC entsprechende Konzentration keine statistisch signifikante Wirkung (Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$) über eine festgelegte Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle.

3.8

höchste Rate ohne statistisch signifikante Wirkung

NOER

geringste Rate eines zu prüfenden Bodens, die gleich unterhalb der LOER (3.6) liegt, die keine statistisch signifikante Wirkung (Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$) über eine festgelegte Kontaktzeit im Vergleich zur Kontrolle zeigt

3.9

Referenzboden

nicht verunreinigter Boden, der vergleichbare Eigenschaften (Nährstoffkonzentrationen, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff und Gefüge) wie der zu prüfende Boden aufweist

3.10

Standardboden

Freilandboden oder künstlicher Boden, dessen wesentliche Eigenschaften (pH-Wert, Gefüge, Gehalt an organischer Substanz) innerhalb eines bekannten Bereichs liegen

BEISPIEL Eurosoils, künstlicher Boden, LUFA-Standardboden Typ 2.2.

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

3.11

Kontrollboden

Referenz oder Standardboden, der als Kontrolle und als Medium für die Herstellung der Verdünnungsreihen mit den zu prüfenden Böden oder einer Referenzsubstanz verwendet wird, der die Validitätskriterien erfüllt

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

3.12

Prüfmischung

Mischung von verunreinigtem Boden oder der Prüfsubstanz (z. B. Chemikalie, Bio-Feststoffe, Abfall) mit dem Kontrollboden

3.13

Prüfmischungs-Verhältnis

Verhältnis zwischen dem zu prüfenden Boden und dem Kontrollboden in einer Prüfmischung

4 Kurzbeschreibung

Weibliche adulte Tiere werden dem zu prüfenden Boden ausgesetzt und die gemessenen Wirkungen auf die Fortpflanzung mit denen von Weibchen verglichen, die einem Kontrollboden ausgesetzt wurden. Dabei werden, falls zutreffend, die Wirkungen durch Kontakt mit einer Verdünnungsreihe von verunreinigtem Boden und Kontrollboden oder gegenüber einem Konzentrationsbereich einer in einen Kontrollboden gemischten Prüfsubstanz bestimmt. Die Prüfmischungen werden zu Prüfbeginn hergestellt und innerhalb des Prüfzeitraumes nicht erneuert. Die Prüfung wird mit 10 weiblichen adulten Tieren pro Prüfgefäß

begonnen. Männchen werden nicht in die Prüfung einbezogen, da die Erfahrung gezeigt hat, dass sich Weibchen umgehend oder kurz nach dem Schlüpfen aus der deutonymphen Phase verpaaren, wenn Männchen anwesend sind. Da die Weibchen etwa 7 Tage nach Erreichen der adulten Phase in die Prüfung eingebracht werden, gelten die Weibchen als bereits verpaart (Anhang A und Anhang E). Die Prüfung läuft bis die ersten Nachkommen die deutonymphen Phase erreicht haben. Bei 20 °C endet die Expositionszeit an Tag 14 nach Einbringung der Weibchen (Tag 0), gefolgt von zwei Tagen der Extraktion. Die Anzahl der überlebenden Weibchen und die Anzahl der juvenilen Tiere je Prüfgefäß werden ermittelt. Die Reproduktionsleistung der den Prüfmischungen ausgesetzten Milben wird mit der der Kontrollen verglichen, um die Konzentrationen zu bestimmen, die keine Wirkungen auf die Mortalität und Reproduktion (NOER/NOEC) hervorrufen und die Konzentration aus x % Reduzierung der aus den Eiern geschlüpften juvenilen Tiere wird verglichen mit der Kontrolle (ER_x/EC_x), abhängig von der experimentellen Auslegung (siehe 7.1.3).

Besteht keine Vorkenntnis über die voraussichtlich wirksame Verdünnung/Konzentration des zu prüfenden Bodens oder der Prüfsubstanz, ist es zweckmäßig, den Versuch in zwei Schritten durchzuführen:

- Eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Reproduktion wird durchgeführt, um eine Angabe zur wirksamen Verdünnung/Konzentration zu erhalten, und der Verdünnung/Konzentration die keine Mortalität (NOER/NOEC) ergibt. Anschließend können die für die Hauptprüfung zu verwendenden Verdünnungen/Konzentrationen ausgewählt werden;
- die Hauptprüfung in Bezug auf die Reproduktion zur Bestimmung der subletalen Wirkungen (der Verdünnungen) des verunreinigten Bodens oder der Konzentration einer Substanz, die nach gleichmäßigem Einmischen in den Standardboden zu keinen signifikanten Wirkungen auf die Anzahl der aus den Eiern geschlüpften Nachkommen im Vergleich zur Kontrolle (NOER/NOEC) zeigt sowie der niedrigsten wirksamen Konzentration (LOER/LOEC).

Die Verwendung eines geeigneten Referenzbodens ist eine erforderliche Bedingung, um den Status der Prüfpopulation nachzuweisen und Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden.

5 Reagenzien und Materialien

5.1 Biologische Materialien

In dieser Prüfung handelt es sich um *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*. Um die Prüfung zu beginnen sind weibliche adulte Tiere (7 Tage bis 14 Tage nachdem sie adult wurden; 28 Tage bis 35 Tage nach Beginn der Eiablage in der Synchronisierung) erforderlich. Die Milben müssen aus einer synchronisierten Kohorte ausgewählt werden (siehe Anhang E).

5.2 Prüfmischung

5.2.1 Freilandboden oder Abfall. Die Freilandböden für die Prüfung sind durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 4 mm zu geben, um grobkörnige Anteile zu entfernen. Falls notwendig, darf der Boden vor dem Sieben ohne Erwärmung luftgetrocknet werden. Die Lagerung der zu prüfenden Böden sollte so kurz wie möglich sein. Der Boden muss nach ISO 18400-206 in Behältern gelagert werden, die die Verluste der Bodenverunreinigungen durch Sorption in die Behälterwände gering halten. Wurden die Böden oder Prüfmischungen gelagert, dann sollten sie unmittelbar vor der Verwendung ein zweites Mal gemischt werden. Der pH-Wert des Bodens sollte nicht geändert werden, da dies die Bioverfügbarkeit der Bodenverunreinigungen beeinflussen kann.

Für die Auswertung der Prüfergebnisse müssen die folgenden Eigenschaften für jede von einer Freilandfläche entnommene Bodenprobe bestimmt werden:

- a) pH-Wert nach ISO 10390;
- b) Körnung (Sand, Lehm, Schluff, Ton) nach ISO 11277;

- c) Wassergehalt nach ISO 11465;
- d) Wasserhaltekapazität nach Anhang B;
- e) Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260;
- f) organischer Kohlenstoff nach ISO 10694;
- g) prozentualer Anteil des beim Sieben mit einer Maschenweite von 4 mm entfernten Materials.

Es ist wichtig, die Wasserhaltekapazität aller bei der Prüfung verwendeten Mischungen zu bestimmen.

5.2.2 Kontrollboden, entweder a) Referenzboden oder b) Standardboden, der die Anwesenheit von Prädatormilben erlaubt. Kontrollboden und der Boden für die Verdünnungsreihen dürfen sich in der gleichen Prüfung nicht unterscheiden [entweder a) oder b)].

- a) Wenn Referenzböden aus nicht verunreinigten Bereichen in der Nähe eines verunreinigten Standorts verfügbar sind, sollten diese wie die zu prüfenden Böden behandelt und charakterisiert werden. Wenn eine toxische Verunreinigung oder ungewöhnliche Bodeneigenschaften nicht ausgeschlossen werden können, sollten Standardkontrollböden bevorzugt werden.
- b) Für die Prüfung der Wirkungen von Substanzen, die in den Boden gemischt werden, müssen Standardböden (z. B. künstlicher Boden, LUFA-Standardboden Typ 2.2.) als Prüfsubstrat verwendet werden. Die Eigenschaften des im Freiland entnommenen Standardbodens müssen aufgezeichnet werden.

Das als „künstlicher Boden“ bezeichnete Substrat kann als ein Standardboden verwendet werden und besitzt die folgende Zusammensetzung:

	Prozentsatz ausgedrückt auf Grundlage des Gehalts an Trockenmasse
— Fein gemahlener Sphagnum-Torf [eine Korngröße von (2 ± 1) mm ist ausreichend) ohne sichtbare Pflanzenreste	5 %
— Kaolin, mit mindestens 30 % Kaolinit	20 %
— Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 0,05 mm bis 0,2 mm aufweist)	74 %

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

ANMERKUNG 1 Unter Berücksichtigung der Eigenschaften hochunpolarer ($\log K_{ow} > 2$) oder ionisierender Substanzen hat sich erwiesen, dass 5 % Torf die gewünschte Struktur des künstlichen Bodens aufrechterhalten.

ANMERKUNG 2 Es wurde bewiesen, dass *Hypoaspis aculeifer* die Validitätskriterien selbst bei Reproduktion erfüllen kann, wenn die Prüfung in Feldböden mit geringerem Gehalt an organischem Kohlenstoff (z. B. 2,7 %) erfolgt und es liegen Erfahrungswerte vor, dass dies in künstlichem Boden mit 5 % Torf erreicht werden kann. Deshalb ist es vor Verwendung eines derartigen Bodens in einer Hauptprüfung nicht notwendig, die Eignung des künstlichen Bodens für die Prüfung nachzuweisen, um die Einhaltung der Validitätskriterien zu ermöglichen, sofern nicht die Torfgehalte geringer sind als die vorstehend genannten.

Der künstliche Boden ist mindestens drei Tage vor Prüfbeginn herzustellen, in dem die vorstehend aufgeführten trockenen Bestandteile in einem großen Labormischer durchmischt werden. Ein Teil des erforderlichen deionisierten Wassers ist während des fortgesetzten Mischens hinzuzufügen. Das für das Einbringen der Prüfsubstanz erforderliche Wasser sollte berücksichtigt werden. Die erforderliche Menge an

Calciumcarbonat kann sich abhängig von den Eigenschaften der einzelnen Charge des Sphagnum-Torfes ändern und sollte unmittelbar vor der Prüfung durch Messung von Teilproben bestimmt werden (siehe Anhang C). Der gemischte künstliche Boden ist bei Raumtemperatur für mindestens zwei Tage zu lagern, um den Säuregehalt ins Gleichgewicht zu bringen. Zur Bestimmung des pH-Wertes und der maximalen Wasserhaltekapazität ist der trockene künstliche Boden durch Zugabe von deionisiertem Wasser für einen oder zwei Tag(e) vor der Prüfung anzufeuchten, bis die Hälfte des erforderlichen Wasseranteils von 40 % bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität erreicht ist.

Die gesamte Wasserhaltekapazität muss entsprechend Anhang B und der pH-Wert muss nach ISO 10390 bestimmt werden.

5.3 Referenzsubstanz

5.3.1 Allgemeines. Zur Qualitätssicherung des Prüfsystems sollten regelmäßig (ein- bis zweimal jährlich) Prüfungen mit einer Referenzsubstanz durchgeführt werden.

Die NOEC und/oder die EC_x einer Referenzsubstanz müssen bestimmt werden, um sicherzustellen, dass die Laborprüfbedingungen angemessen sind und um zu bestätigen, dass sich die Wirkung der Prüforganismen im Laufe der Zeit nicht verändert hat. Die Referenzsubstanz kann parallel zur Toxizitätsmessung einer jeden Prüfsubstanz bei einer Konzentration geprüft werden, für die im Voraus in einer Dosis-Wirkungsstudie belegt werden muss, dass sie zu einer Wirkung von etwa 50 % führt. In diesem Fall sollte die Anzahl der Wiederholungen der in den Kontrollen entsprechen. Alternativ wird die Referenzsubstanz ein- oder zweimal jährlich in einer Dosis-Wirkungs-Prüfung geprüft. Abhängig von der gewählten Auslegung ist die Anzahl der Konzentrationen, Wiederholungen und der Faktor der Konzentrationsabstufungen unterschiedlich (siehe 7.1.3), allerdings sollte eine Wirkung zwischen 10 % und 90 % erreicht werden (Faktor der Konzentrationsabstufung 1,8). Geeignete Referenzsubstanzen sind Dimethoat und Borsäure, von denen eine Beeinträchtigung der Reproduktion belegt ist [25].

Die EC_{50} für Dimethoat, die auf der Anzahl an juvenilen Tieren basiert, sollte in den Bereich zwischen 3,0 mg a. s. (aktive Substanz)/kg Boden (Trockenmasse) und 7,0 mg a. s. (aktive Substanz)/kg Boden (Trockenmasse) fallen. Auf Grundlage der mit Borsäure bis dato erhaltenen Ergebnisse, sollte die EC_{50} , die auf der Anzahl an juvenilen Tieren basiert, in den Bereich zwischen 100 mg/kg (Trockenmasse) Boden und 300 mg/kg (Trockenmasse) Boden fallen.

5.3.2 Dimethoat (CAS 60-51-5), $C_5H_{12}NO_3PS_2$, als Rezeptur zu prüfen [z. B. Perfekthion¹ (ca. 40 % Dimethoat)].

5.3.3 Borsäure (CAS 10043-35-3), H_3BO_3 (99 %)).

WARNUNG — Bei der Handhabung dieser Substanzen sollten zur Vermeidung von Ingestion oder Hautkontakt geeignete Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

6 Geräte

Übliche Laborausstattung und folgende verwenden.

6.1 Prüfgefäße aus Glas oder anderem chemisch inerten Material mit einem Fassungsvermögen von etwa 100 ml und mit einem Durchmesser von etwa 5 cm, mit Deckeln (z. B. dicht verschließbare Kunststoff- oder Glasdeckel oder Parafilm).

1 Perfekthion ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, das im Handel erhältlich ist. Diese Information dient der Benutzerfreundlichkeit dieses Dokuments und stellen keine Billigung dieses Produkts durch die ISO dar.

6.2 Geräte zur Bestimmung der Trockenmasse des Substrats nach ISO 11465.

6.3 Großer Labormischer für die Herstellung der Prüfmischungen (5.2).

6.4 Geeignete genaue Waagen.

6.5 Geräte zur Bestimmung der pH-Werte und des Wassergehalts des Substrats.

6.6 Absaugvorrichtung zur Übertragung von Milben (siehe ISO 11267:2014, A.2).

6.7 Prüfumgebung

6.7.1 Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

6.7.2 Lichtquelle, die bei einem geregelten Hell/Dunkel-Zyklus von 12 Stunden : 12 Stunden und 16 Stunden : 8 Stunden eine konstante Lichtintensität von 400 lx bis 800 lx an die Substratoberfläche abgeben kann.

6.8 Extraktionsapparat: Tullgren-Trichter oder vergleichbares Verfahren, wie beispielsweise McFadyen (siehe Anhang D).

7 Durchführung

7.1 Prüfaufbau

7.1.1 Allgemeines

Eine Probe des unter Freilandbedingungen entnommenen Bodens kann sowohl mit einer einzelnen Konzentration (üblicherweise 100 %) geprüft oder hinsichtlich der Toxizität in einer Prüfung mit Mehrfachkonzentrationen bewertet werden, wobei eine Reihe von Konzentrationen (Verdünnungen) durch Mischen abgemessener Mengen mit einem Kontrollboden (5.2.2) hergestellt wird. Werden Substanzen geprüft, wird eine Reihe von Konzentrationen durch Mischen der Prüfsubstanzmengen mit einem Standardboden (z. B. künstlicher Boden) hergestellt. Die Konzentrationen werden in Milligramm Prüfsubstanz je Kilogramm getrockneten Kontrollboden (5.2.2) angegeben. Abhängig von der Kenntnis entsprechender Wirkungsschwellen darf eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Hauptprüfung vorausgehen. Jede Hauptprüfung besteht aus einer Reihe von Bodenmischungen (Prüfgliedern).

7.1.2 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (Vorprüfung)

Eine Vorprüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs des Mischverhältnisses, das Prädatormilben beeinträchtigt, ist optional, z. B. 0 %, 1 %, 5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % Boden oder der Prüfsubstanz, z. B. 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg und 1 000 mg/kg [die Konzentrationen sind dabei in Milligramm an Prüfsubstanz je Kilogramm getrocknetem Kontrollboden (5.2.2) angegeben und eine Kontrolle verwendet 10 Milben je Behälter]. Die Vorprüfung wird ohne Wiederholung durchgeführt. Die Dauer der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs beträgt 14 Tage (Expositionsdauer), gefolgt von einer Extraktionsdauer von zwei Tagen. Nach insgesamt 16 Tagen werden die Mortalität der adulten Milben und die Anzahl der juvenilen Tiere bestimmt. Auf Grundlage der Ergebnisse der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs wird die ER_{50}/EC_{50} grob durch Berechnung des geometrischen Mittelwerts der beiden Konzentrationen bestimmt, die 0 % und 100 % Mortalität angeben. Der Konzentrations-/Verdünnungsbereich in der abschließenden Prüfung sollte vorzugsweise so gewählt werden, dass er Konzentrationen enthält, bei denen eine Anzahl juveniler Tiere beeinträchtigt wird, das Überleben der mütterlichen Generation hingegen nicht. Dies ist allerdings möglicherweise nicht bei Substanzen möglich, die in ähnlichen Konzentrationen letale und subletale Wirkungen hervorrufen.

Wenn keine Wirkungen beobachtet werden, selbst bei 100%ig verunreinigtem Boden oder bei Konzentrationen von 1 000 mg/kg Prüfsubstanz zu Standardboden (Trockenmasse), kann die Vorprüfung als eine Grenzwertprüfung gestaltet werden.

7.1.3 Hauptprüfung

Der Aufbau der Hauptprüfung hängt von den Prüfzielen ab. Üblicherweise werden die Lebensraumeigenschaften eines im Freiland beprobten Bodens dadurch ermittelt, dass die biologischen Auswirkungen für den zu prüfenden Boden mit denen in einem Referenzboden, oder falls letzterer nicht verfügbar bzw. aufgrund von Toxizität oder untypischen physikochemischen Eigenschaften nicht geeignet ist, mit den Auswirkungen in einem Standardboden verglichen werden. Die für den Standardboden ermittelten Ergebnisse helfen bei der Unterscheidung der von der Verunreinigung ausgehenden Wirkungen von denjenigen, die verursacht durch die physikochemischen Bodeneigenschaften nicht von der Verunreinigung ausgehen. Ungeachtet dessen, ob ein Referenzboden oder Standardboden für die statistischen Vergleiche verwendet wird, sind die Ergebnisse mit dem Standardboden zur Beurteilung der Gültigkeit und Eignung der Prüfung [27] zu verwenden. Die Dauer der Hauptprüfung beträgt 14 Tage (Expositionsdauer), gefolgt von einer Extraktionsdauer von zwei Tagen. Nach insgesamt 16 Tagen werden die Mortalität der adulten Milben und die Anzahl der juvenilen Tiere bestimmt.

Ist für Charakterisierungszwecke ein Prüfaufbau erforderlich, der Verdünnungsreihen einschließt, sind drei Konzepte möglich (die Konzentrationsabstufungen dürfen den Faktor 2 nicht überschreiten):

- Bei der Vorgehensweise mit NERO/NOEC sollten mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe verwendet werden. Für jede Behandlung werden vier Wiederholungen zuzüglich acht Kontrollen empfohlen.
- Bei der Vorgehensweise mit ER_x/EC_x sollten 12 Konzentrationen oder Prüfmischungen verwendet werden. Für jede Konzentration werden zwei Wiederholungen zuzüglich sechs Kontrollen empfohlen. Der Faktor der Konzentrationsabstufungen kann variabel sein; kleiner bei geringeren Konzentrationen, größer bei höheren Konzentrationen.
- Bei der gemischten Vorgehensweise mit sollten mindestens sechs bis acht Konzentrationen in einer geometrischen Reihe verwendet werden. Für jede Behandlung werden vier Wiederholungen zuzüglich acht Kontrollen empfohlen. Diese gemischte Vorgehensweise ermöglicht sowohl eine NERO-/NOEC- als auch eine ER_x/EC_x -Bewertung.

Um die Überprüfung des pH-Wertes und der Feuchtigkeit des Prüfsubstrates zu ermöglichen, wird die Verwendung zusätzlicher Gefäße für jede Konzentration und für die Kontrolle empfohlen.

Jedes Prüfgefäß (Wiederholung) wird mit 20 g Trockenmasse des Prüfsubstrates gefüllt. Um die Einwanderung der Milben zu erleichtern, sollte das Substrat im Prüfgefäß nicht verdichtet werden.

7.1.4 Grenzwertprüfung

Wenn bei der höchsten Konzentration in der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (z. B. 1 000 mg/kg oder 100 %) keine Wirkungen beobachtet werden, kann die Reproduktionsprüfung als Grenzwertprüfung mit einer Prüfkonzentration von 1 000 mg/kg oder unverdünntem Boden durchgeführt werden. Eine Grenzwertprüfung bietet die Möglichkeit zu belegen, dass die NOEC/NERO oder EC_{10}/ER_{10} für die Reproduktion größer als die Grenzkonzentration sind, während die Anzahl der in der Prüfung verwendeten Milben minimiert wird. Sowohl für den sanierten als auch für den Kontrollboden sollten acht Wiederholungen durchgeführt werden.