

DIN EN ISO 23266



ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2021-02-11

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von verunreinigten Böden auf
das Überleben und die Reproduktion von Hornmilben (*Oppia nitens*)
(ISO 23266:2020);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23266:2020**

Soil quality –

Test for measuring the inhibition of reproduction in oribatid mites (*Oppia nitens*) exposed to contaminants in soil (ISO 23266:2020);

German and English version prEN ISO 23266:2020

Qualité du sol –

Essai de détermination de l'inhibition de la reproduction chez les acariens oribates (*Oppia nitens*) exposés aux contaminants dans le sol (ISO 23266:2020);

Version allemande et anglaise prEN ISO 23266:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-12-11 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 oder 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 79 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 23266:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ als prEN ISO 23266:2020 übernommen, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11265	siehe	DIN ISO 11265
ISO 18400-206	siehe	DIN ISO 18400-206
ISO 21286	siehe	DIN EN ISO 21286

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 21286, *Bodenbeschaffenheit — Identifizierung der Testorganismenarten für ökotoxikologische Tests mit Hilfe von DNA-Barcoding*

DIN ISO 11265, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit*

DIN ISO 18400-206, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 206: Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Beurteilung von biologischen funktionalen und strukturellen Endpunkten im Labor*

<i>Titel de:</i>	Bodenbeschaffenheit — Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von verunreinigten Böden auf das Überleben und die Reproduktion von Hornmilben (<i>Oppia nitens</i>) (ISO 23266:2020)
<i>Titel en:</i>	Soil quality — Test for measuring the inhibition of reproduction in oribatid mites (<i>Oppia nitens</i>) exposed to contaminants in soil (ISO 23266:2020)
<i>Titel fr:</i>	Qualité du sol — Essai de détermination de l'inhibition de la reproduction chez les acariens oribates (<i>Oppia nitens</i>) exposés aux contaminants dans le sol (ISO 23266:2020)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	10
5 Reagenzien und Material	11
6 Geräte	14
7 Durchführung	14
7.1 Untersuchungsdesign	14
7.1.1 Allgemeines	14
7.1.2 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (Vorversuch)	15
7.1.3 Hauptprüfung	15
7.2 Herstellung der Prüfmischung	16
7.2.1 Prüfung des kontaminierten Bodens	16
7.2.2 Prüfung von Substanzen, die dem Prüfsubstrat zugegeben werden	17
7.2.3 Vorbereitung der Kontrollansatzbehälter	18
7.3 Zugabe der Milben	18
7.4 Prüfbedingungen und Messungen	18
7.5 Bestimmung der Überlebensrate der Imagines und der Reproduktionsleistung	19
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	19
8.1 Berechnung	19
8.2 Angabe der Ergebnisse	19
9 Gültigkeit der Prüfung	20
10 Statistische Analyse	20
10.1 Allgemeines	20
10.2 Prüfungen mit nur einer Konzentration	20
10.3 Prüfungen mit mehreren Konzentrationen	21
10.3.1 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs	21
10.3.2 Hauptprüfung	21
11 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Methoden zur Haltung und Zucht von <i>Oppia nitens</i>	24
A.1 Bedingungen für die Haltung und Zucht	24
A.1.1 Allgemeine Biologie [24]	24
A.1.2 Zuchtsubstrat	24
A.1.3 Zuchtbehälter	25
A.1.4 Klimabedingungen	25
A.1.5 Futter	25
A.1.6 Handhabung und Umsetzen	25
A.2 Synchronisation von Kulturen	26

A.3	Veranschaulichende Fotoaufnahmen von <i>Oppia nitens</i> , entnommen aus [24]	27
Anhang B (normativ) Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens		28
B.1	Allgemeines	28
B.2	Geräte	28
B.3	Durchführung	28
B.4	Berechnung des Wasserrückhaltevermögens (WHC)	28
Anhang C (informativ) Anleitung zur Einstellung des pH-Werts von künstlichem Boden		29
Anhang D (informativ) Extraktion und Auszählung von <i>Oppia nitens</i>		30
D.1	Allgemeines	30
D.2	Vom Prüflaboratorium für Umwelt und Klimawandel Kanada entwickelte Vorgehensweise	31
D.3	Alternative Methoden zur Extraktion durch Wärmebehandlung	32
D.3.1	Erste alternative Methode	32
D.3.2	Zweite alternative Methode	32
Anhang E (informativ) Leistungsfähigkeit des Verfahrens		34
E.1	Allgemeines	34
E.2	Validitätskriterien	34
E.3	Internationale Vergleichsprüfungen durch Prüflaboratorien (Ringversuch)	34
E.3.1	Ergebnisse der Leistungsprüfung an Kontrollansätzen	35
E.3.2	Bei Borsäure in Freilandboden erzielte Ergebnisse (Runde 2)	37
E.3.3	Bei Borsäure in Standardboden (LUFA 2.2) erzielte Ergebnisse (Runde 3)	38
Literaturhinweise		40

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 23266:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ als prEN ISO 23266:2020 übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 23266:2020 wurde von CEN als prEN ISO 23266:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen 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

Zur Gewinnung von Informationen über die Wirkungen von Verunreinigungen bzw. Kontaminanten in Böden finden ökotoxikologische Prüfsysteme Anwendung; sie werden als Ergänzung zur herkömmlichen chemischen Analyse vorgeschlagen (siehe ISO 15799 [1] und ISO 17616 [2]). ISO 15799 enthält eine Aufstellung und Kurzcharakterisierung von empfohlenen und genormten Prüfsystemen, und ISO 17616 gibt eine Anleitung für die Auswahl und Beurteilung von Biotestverfahren. Um Informationen über den Anteil der Kontaminanten zu erlangen, die möglicherweise über den Wasserweg (Rückhaltefunktion von Böden) das Grundwasser erreichen, werden aquatische Prüfsysteme mit Bodeneluat eingesetzt, wohingegen zur Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden im Hinblick auf die unterstützende Bodenbiota und Interaktionen innerhalb dieser terrestrische Prüfsysteme verwendet werden.

Milben (Acari) sind eine weltweit verbreitete und vielfältige Gruppe von Arthropoden, die zu einer Unterklasse der Spinnentiere (Arachnida) mit über 40 000 erfassten Arten gehören, die sich in zwei Überordnungen (Acariformes und Parasitiformes) unterteilen. Aufgrund ihrer relativ geringen Größe (einige µm bis einige cm) besetzen sie spezifische ökologische Nischen sowohl auf Pflanzen als auch in Böden [5].

In den letzten Jahren wurde die Entwicklung biologischer Prüfverfahren zur Beurteilung verunreinigter bzw. kontaminierter Böden verstärkt vorangetrieben, während davor die Prüfverfahren für andere Medien (z. B. Wasser und Sediment) traditionell einen Entwicklungsvorsprung aufwiesen. Bei ökotoxikologischen Prüfungen für Böden bestehen Herausforderungen u. a. aufgrund der Komplexität von Bodensystemen (z. B. mangelnde Homogenität) und der Vielfalt der Expositionswege (z. B. über die Nahrungsaufnahme, die Exposition gegenüber Porenwasser oder Bodenluft oder den direkten Kontakt mit Bodenpartikeln). Ein neu entwickeltes Verfahren (ISO 21285 [3]) beurteilt die Wirkungen von kontaminiertem Boden auf die Reproduktion der Raubmilbe (*Hypoaspis aculeifer*) vorrangig anhand der Nahrungsaufnahme. Hornmilben besetzen im Boden eine andere ökologische Nische als *H. aculeifer*, die aber sehr wichtig ist – sie tragen zur Kohlenstoffmineralisierung und Bodenbildung sowie zur Stickstoff- und Phosphorfreisetzung infolge Fraßaktivitäten bei. Hornmilben zählen zu den vielfältigsten und am häufigsten vorkommenden Mikroarthropodenarten im Boden. Ihr langsamerer Stoffwechsel und ihre langsamere Entwicklung in Verbindung mit einer geringen Fruchtbarkeit, einer langen Lebensdauer und einer begrenzten Verbreitungsfähigkeit erhöhen jedoch ihr Potenzial, bei kurz- und langzeitigen Störungen anfällig und empfindlich zu reagieren [6]. Die Verwendung von Hornmilben im Rahmen von bodenökotoxikologischen Prüfungen ist gründlich untersucht worden [7] [8] [9] [10] [11]. Neuere Forschungen, bei denen *Oppia nitens* für Bodenuntersuchungen verwendet wurde, haben die Anwendbarkeit und die relative Empfindlichkeit der Art bei der Beurteilung kontaminierter Böden aus sowohl ackerbaulichen Regionen als auch aus der borealen Ökozone und der Taiga aufgezeigt [6] [12] [13] [14] [15]. Außerdem wurde durch die Forschung ihre Empfindlichkeit gegenüber Metallen [16] [17] [18] [19], Pestiziden [20] [21] und organischen Verbindungen [16] [17] [22] nachgewiesen. *Oppia nitens* ist eine Hornmilbe, die die obere organische Schicht des Bodens bewohnt und zur größten Oribatenfamilie (Oppiidae) mit ungefähr 1 000 Arten in 129 Gattungen gehört, die in der Holarktis und der Antarktis weit verbreitet sind [23]. Es handelt sich dabei um sich sexuell fortpflanzende, polyphage Pilzfresser, die im Labor problemlos in Boden oder auf gebranntem Gips bei einer Ernährung mit Backhefe gezüchtet werden können [10].

Dieses Verfahren behandelt Vorgehensweisen zur Durchführung von 28-Tage-Prüfungen zur Bestimmung der Wirkungen von kontaminierten Böden auf das Überleben und die Reproduktionsleistung der Hornmilbe, *Oppia nitens*. Wahlweise kann das Verfahren zur Prüfung von Chemikalien verwendet werden, die Standardböden (z. B. künstlichem Boden) zugesetzt werden, um ihr letales und subletales Gefährdungspotenzial für Hornmilben zu ermitteln. Die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens wurde in einem internationalen Ringversuch beurteilt [15], wie in Anhang E zusammengefasst. Milben stellen Lebensgemeinschaften dar, die bei einer Umweltgefährdungsbeurteilung nicht außen vor gelassen werden können. Diese Art wird als repräsentativ für nicht räuberische Bodenmilben angesehen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt eines der Verfahren zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden und zur Bestimmung der Wirkungen von Bodenkontaminationen und einzelnen chemischen Substanzen auf die Reproduktionsleistung der Hornmilbe *Oppia nitens* bei Aufnahme über die Haut und mit der Nahrung fest. Diese (28-tägige) Dauerprüfung ist auf Böden und Bodenmaterialien unbekannter Beschaffenheit (z. B. Altlasten, verbesserte Böden, Böden nach einer Sanierung, landwirtschaftlich genutzte oder andere Böden, bei denen ein Prüfanlass besteht, und Abfallmaterialien) anwendbar. Dieses Verfahren ist weder als Ersatz für Prüfungen mit Regenwürmern oder Collembolen vorgesehen, da es eine andere taxonomische Gruppe (= Milben; d. h. Arachniden) in den Fokus stellt, noch als Ersatz für die Raubmilbenprüfung, da diese Art eine andere trophische Ebene und ökologische Nische repräsentiert.

Die Wirkungen von Substanzen werden unter Verwendung von Standardboden, vorzugsweise einem definierten künstlichen Bodensubstrat, beurteilt. Bei kontaminierten Böden werden die Wirkungen im Prüfboden und in einem Kontrollboden bestimmt. In Abhängigkeit von der Zielsetzung der Untersuchung sollte für den Kontrollansatz und das Substrat zum Strecken bzw. Verdünnen (Verdünnungsreihen von kontaminiertem Boden) entweder ein nicht kontaminierter Boden mit ähnlichen Eigenschaften wie die zu prüfende Bodenprobe (Referenzboden) oder ein Standardboden (z. B. künstlicher Boden) verwendet werden.

Es werden Informationen darüber gegeben, wie dieses Verfahren zur Prüfung von Substanzen unter gemäßigten Bedingungen anzuwenden ist.

Dieses Dokument gilt nicht für Substanzen, bei denen der Luft/Boden-Verteilungskoeffizient größer als 1 ist oder bei denen der Dampfdruck bei 25 °C 300 Pa übersteigt.

ANMERKUNG Es kann nicht sichergestellt werden, dass die Prüfsubstanz während der gesamten Prüfdauer stabil bleibt. Bei dem Prüfverfahren sind keine Vorkehrungen zur Überwachung der Persistenz der zu prüfenden Substanz vorgesehen.

WARNUNG — Kontaminierte Böden können unbekannte Gemische von giftigen, mutagenen oder anderweitig schädlichen Chemikalien oder infektiösen Mikroorganismen enthalten. Durch Staub und verdunstete Chemikalien können während der Handhabung und der Inkubation Arbeitsschutzrisiken entstehen. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um einen Hautkontakt zu vermeiden.

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 11265, *Soil quality — Determination of the specific electrical conductivity*

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: Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity 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 <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Verunreinigung Kontaminant

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

3.2

Wirkungskonzentration

EC_x, en: effect concentration

Konzentration (Massenanteil) einer Analysenprobe oder einer Prüfsubstanz, die an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer vorgegebenen Expositionsdauer im Vergleich zu einem Kontrollansatz x % einer Wirkung verursacht

BEISPIEL Eine EC₅₀ ist eine Konzentration, die an einem Endpunkt der Prüfung voraussichtlich bei 50 % der während einer festgelegten Expositionsdauer exponierten Population eine Wirkung hervorruft.

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

3.3

Wirkungsrate

ER_x, en: effect rate

Rate eines zu prüfenden Bodens, die an einem gegebenen Endpunkt innerhalb einer vorgegebenen Expositionsdauer im Vergleich zu einem Kontrollansatz x % einer Wirkung hervorruft

3.4

letale Konzentration

LC_x, en: lethal concentration

Konzentration (Massenanteil) einer Analysenprobe oder einer Prüfsubstanz, die im Vergleich zu einem Kontrollansatz x % der Mortalität innerhalb einer vorgegebenen Expositionsdauer hervorruft

BEISPIEL Eine LC₅₀ ist eine Konzentration, die innerhalb einer festgelegten Expositionsdauer eine voraussichtliche Mortalität von 50 % der exponierten Population hervorruft.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die LC_x wird als prozentualer Anteil des zu prüfenden Bodens (Trockenmasse) je Bodenmischung (Trockenmasse) angegeben. Werden Substanzen geprüft, wird die LC_x als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse Boden in Milligramm je Kilogramm angegeben.

3.5

Grenzwertprüfung

Prüfung, die mit nur einer Konzentration und jeweils mindestens fünf Replikaten am *Prüfboden* (3.14) ohne jegliche Verdünnung oder bei der höchsten Konzentration der in den Kontrollboden eingemischten Prüfsubstanz und am Kontrollansatz durchgeführt wird

3.6

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

LOEC, en: lowest observed effect concentration

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei dieser Prüfung wird die LOEC als prozentualer Anteil des zu prüfenden Bodens (Trockenmasse) je Bodenmischung (Trockenmasse) oder als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des zu prüfenden Bodens angegeben. Sämtliche Prüfkonzentrationen, die über der LOEC liegen, sollten üblicherweise eine Wirkung zeigen, die sich statistisch von der Kontrollprobe unterscheidet.

3.7

geringste Rate, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

LOER, en: lowest observed effect rate

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

3.8

höchste Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung

NOEC, en: no observed effect concentration

höchste geprüfte Konzentration (Massenanteil) einer Analysenprobe oder einer Prüfsubstanz unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der keine Wirkung beobachtet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei dieser Prüfung zeigt die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer vorgegebenen Expositionsdauer im Vergleich zum Kontrollansatz keine statistisch signifikante Wirkung (Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$).

3.9

höchste Rate ohne statistisch signifikante Wirkung

NOER, en: no observed effect rate

geringste Rate eines zu prüfenden Bodens unmittelbar unterhalb der LOER, die im Vergleich zum Kontrollansatz innerhalb einer vorgegebenen Expositionsdauer keine statistisch signifikante Wirkung (Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$) zeigt

3.10

Reproduktion

Reproduktionsleistung

durchschnittliche Anzahl der Nachkommen je Prüfgefäß nach einer 28-tägigen Inkubation unter den festgelegten Prüfbedingungen

3.11

Referenzboden

nicht kontaminierter Boden, der vergleichbare pedologische Eigenschaften (Nährstoffkonzentrationen, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff und Bodentextur) wie der *Prüfboden* (3.14) aufweist

3.12

Standardboden

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

BEISPIEL EURO-Soils, künstlicher Boden, LUFA-Standardboden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Eigenschaften von Standardböden können von denen des Prüfbodens abweichen.

3.13

Kontrollboden

Referenz- oder *Standardboden* (3.12), der als Kontrolle und als Medium zur Herstellung von Verdünnungsreihen mit Prüfböden/Analysenproben oder einer Referenzsubstanz verwendet wird und die Validitätskriterien erfüllt

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei einem natürlichen Boden ist es ratsam, seine Eignung für eine Prüfung und die Erfüllung der Validitätskriterien für die Prüfung nachzuweisen, bevor er in einer Hauptprüfung verwendet wird.

3.14

Prüfboden

Probe von Freilandboden oder chemisch angereichertem Boden, dessen Toxizität für Milben zu bestimmen ist

3.15

Prüfmischung

Mischung von kontaminiertem Boden oder der Prüfsubstanz (z. B. Chemikalie, Biofeststoff, Abfall) mit *Kontrollboden* (3.13)

Anmerkung 1 zum Begriff: Prüfmischungen werden in Prozent des kontaminierten Bodens auf der Grundlage der Bodentrockenmasse angegeben.

3.16

Prüfmischungsverhältnis

Verhältnis von Prüfboden zu Kontrollboden in einer *Prüfmischung* (3.15)

Anmerkung 1 zum Begriff: Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu ermitteln, dürfen unterschiedliche Verhältnisse in einer Verdünnungsreihe verwendet werden.

4 Kurzbeschreibung

Es werden die Wirkungen auf die Reproduktionsleistung adulter, im Labor gezüchteter Milben *Oppia nitens*, die dem Prüfboden ausgesetzt wurden, mit denen verglichen, die bei Organismen in Kontrollboden beobachtet wurden. Die Wirkungen, falls zutreffend, werden durch Exposition gegenüber einer Prüfmischung des kontaminierten Bodens und einem Kontrollboden oder gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen einer in einen Kontrollboden eingemischten Prüfsubstanz bestimmt. Die Prüfmischungen werden zu Beginn der Prüfung hergestellt und innerhalb des Prüfzeitraums nicht erneuert.

Die Prüfung wird mit 15 adulten Milben aus alterssynchronisierten Kulturen (im Alter von 8 d bis 10 d nach der Ekdysis (d. h. Häutung) zur adulten Form) je Prüfgefäß gestartet. Die Prüfung wird in 30-ml-Glasgefäßen mit einer Feuchtgutmasse durchgeführt, die einem Volumen von etwa 20 ml Boden entspricht, und für jede Aufbereitung werden mindestens fünf Replikate vorbereitet. Die Prüfung erfolgt über 28 d bei $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Während dieser Zeit schlüpfen aus den von den Imagines gelegten Eiern Nachkommen (F_1). Die Anzahl der produzierten Nachkommen wird bestimmt. Außerdem wird am Ende der Prüfung die Überlebensrate der Imagines bestimmt. In Abhängigkeit vom Untersuchungsdesign werden die in den Prüfungen gewonnenen Ergebnisse mit einem Kontrollansatz verglichen oder, falls es sich um ein Design mit Verdünnungsreihe(n) handelt, zur Bestimmung der Konzentration verwendet, die zu einer Reduktion der produzierten juvenilen

Formen um $x\%$ im Vergleich zum Kontrollansatz (EC x , 28 d) führt. Bei einer Prüfkonzentration, die schätzungsweise eine Mortalität von $x\%$ zur Folge hat (LC x , 28 d), ist ein optionaler Endpunkt der Prüfung erreicht. Bei einem Untersuchungsdesign, bei dem die Hypothese auf mehreren Konzentrationen basiert, wird die Reproduktionsleistung der Milben, die den Prüfmischungen ausgesetzt sind, mit jener der Kontrollansätze verglichen, um die Konzentration zu bestimmen, die keine Wirkungen auf Mortalität und Reproduktion hervorruft (NOEC).

In Fällen, in denen keine Vorkenntnisse über die Verdünnung/Konzentration des zu prüfenden Bodens oder der Prüfsubstanz, die wahrscheinlich eine Wirkung hat, vorliegen, ist es zweckmäßig, die Prüfung in zwei Schritten durchzuführen:

- eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (en: range-finding test), um einen Anhaltspunkt für die Wirkungsverdünnung/-konzentration und die Verdünnung/Konzentration, die keine Mortalität verursacht, zu erhalten. Anschließend können die für die Hauptprüfung zu verwendenden Verdünnungen/Konzentrationen ausgewählt werden; und
- die Hauptprüfung, um die letalen und subletalen Wirkungen von (Verdünnungen von) kontaminiertem Boden oder die Konzentration einer Substanz zu bestimmen, die bei gleichmäßiger Einmischung in den Standardboden Folgendes verursacht: 1) $x\%$ Hemmung der Reproduktion, EC x (z. B. EC10, EC20 oder EC50) oder 2) keine signifikanten Wirkungen auf die Anzahl der geschlüpften Nachkommen im Vergleich zum Kontrollansatz für die Schätzung der NOEC und der LOEC.

Die Verwendung eines Referenzbodens ist eine grundlegende Voraussetzung, um den Zustand der Prüfpopulation aufzuzeigen und Fehlinterpretationen von Ergebnissen zu vermeiden.

5 Reagenzien und Material

5.1 Biologisches Material

Bei dieser Prüfung werden frisch gehäutete adulte Milben, *Oppia nitens* C.L. Koch 1836, die ein Alter von 8 d bis 10 d (d. h. 8 d bis 10 d nach der Ekdysis bis zur adulten Form) aufweisen und über einen 1- bis 3-tägigen Zeitraum gesammelt wurden, für den Start der Prüfung benötigt. Die Milben müssen aus einer alterssynchronisierten Kultur ausgewählt sein. Ein Verfahren zum Kultivieren von *Oppia nitens* und zum Erzielen von alterssynchronisierten Prüforganismen ist in Anhang A angegeben.

Adulte *Oppia nitens* werden aus Laborkulturen gewonnen, die unter Temperaturbedingungen, einem Licht-Dunkel-Zyklus und Ernährungsbedingungen gehalten werden, die denen bei der Prüfung ähnlich sind. Die Identifizierung der Art sollte durch befähigte Personen mit Erfahrungen bei der Identifizierung von Bodenmilben anhand der charakteristischen taxonomischen Merkmale, beschrieben in taxonomischen Schlüsseln [26], oder unter Verwendung der DNA-basierten taxonomischen Identifizierung (d. h. Barcoding) nach ISO 21286 [4] bestätigt werden. Alle bei einer Prüfung verwendeten Milben müssen derselben Population und derselben Bezugsquelle entstammen. Bezugsquellen von Tieren, die zum Anlegen von Kulturen verwendet werden sollen, sind staatliche oder private Laboratorien, die *Oppia nitens* für Bodentoxizitätsprüfungen züchten, oder kommerzielle Lieferanten von Biologika [24].

5.2 Prüfmischung kann aus Freilandboden oder aus Kontrollboden, gemischt mit dem Prüfboden oder angereichert mit der Prüfsubstanz, bestehen.

5.2.1 Freilandboden oder Abfall

Bei der Probe (den Proben) kann es sich um Freilandboden von einem Industrie-, Landwirtschafts- oder anderen Standort mit Prüfanlass handeln oder um Abfallmaterial, für das eine Endlagerung im Boden in Betracht gezogen wird (z. B. Baggergut, kommunaler Klärschlamm aus Kläranlagen, Kompost oder Stalldung).

Die Freilandböden für diese Prüfung müssen zum Entfernen grobkörniger Anteile durch ein Sieb mit Quadratmaschen von 4 mm bis 10 mm gegeben und gründlich gemischt werden. Falls dies erforderlich ist, darf der Boden vor dem Sieben ohne Erwärmung luftgetrocknet werden. Die Lagerung des Prüfbodens sollte so kurz wie möglich sein. Der Boden muss nach ISO 18400-206 in Behältern gelagert werden, die die Verluste an Bodenkontaminanten durch Verflüchtigung und Sorption an den Behälterwänden so gering wie möglich halten. Wenn Böden oder Prüfmischungen gelagert wurden, sollten sie unmittelbar vor der Verwendung ein zweites Mal gemischt werden. Der pH-Wert des Bodens sollte nicht geändert werden, da er die Bioverfügbarkeit von Bodenkontaminanten beeinflussen kann.

ANMERKUNG Ein Sieb mit einer Maschenweite von 4 mm ist für alle vorwiegend mineralischen Böden mit relativ wenig organischer Substanz (z. B. landwirtschaftliche Böden) geeignet, bei forstwirtschaftlichen Böden oder Feuchtböden mit einem höheren Gehalt an organischer Substanz könnten jedoch Siebe mit größeren Maschenweiten (z. B. 6 mm bis 8 mm für forstwirtschaftliche Böden und 8 mm bis 10 mm für Feuchtböden) erforderlich sein.

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

- a) pH-Wert nach ISO 10390;
- b) Bodentextur (Sand, Lehm, Schluff) nach ISO 11277;
- c) Wassergehalt nach ISO 11465;
- d) Wasserrückhaltevermögen nach Anhang B;
- e) Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260;
- f) elektrische Leitfähigkeit nach ISO 11265;
- g) organischer Kohlenstoff nach ISO 10694;
- h) prozentualer Anteil des ausgesiebten Materials.

ANMERKUNG Es ist wichtig, das Wasserrückhaltevermögen aller bei der Prüfung verwendeten Mischungen zu messen.

5.2.2 Kontrollboden, entweder a) Referenzboden (3.11) oder b) Standardboden (3.12), der die Anwesenheit von Hornmilben erlaubt. Kontrollboden und zur Verdünnung verwendeter Boden dürfen sich bei einer Prüfung nicht unterscheiden (entweder a) oder b)).

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

Das als künstlicher Boden bezeichnete Substrat kann wie ein Standardboden verwendet werden und weist die folgende Zusammensetzung auf:

	Prozentualer Anteil, bezogen auf die Trockenmasse
— Sphagnumtorf, fein gemahlen (eine Korngröße von (2 ± 1) mm ist annehmbar) und ohne sichtbare Pflanzenreste	10 %
— Kaolin, vorzugsweise mit nicht weniger als 30 % Kaolinit	20 %
— Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 0,05 mm bis 0,2 mm aufweist).	70 %

ANMERKUNG Es ist nachgewiesen worden, dass *Oppia nitens* die Validitätskriterien (Überlebensrate und Reproduktionsleistung) einhalten kann, wenn Freilandböden mit einem niedrigeren Gehalt an organischer Substanz (z. B. 2,6 %) [24] geprüft werden, und die Erfahrung zeigt, dass in künstlichem Boden mit 10 % Torf die Validitätskriterien erfüllt werden können. Deshalb ist es nicht notwendig, vor einer Verwendung eines solchen Bodens in einer Hauptprüfung nachzuweisen, dass der künstliche Boden geeignet ist, die Validitätskriterien zu erfüllen, es sei denn, der Torfgehalt wird stärker gesenkt als vorstehend angeben [24].

Der künstliche Boden wird wenigstens drei Tage vor Beginn der Prüfung hergestellt, indem die vorstehend aufgeführten trockenen Bestandteile in einem großen Labormischer gründlich gemischt werden. Eine Anleitung zum Einstellen des pH-Werts des künstlichen Bodens wird in Anhang C gegeben; der optimale pH-Wert-Bereich für die Prüfung mit *O. nitens* liegt bei $7,0 \pm 0,5$ [24]. Ein Teil des erforderlichen Deionats wird unter Mischen zugegeben. Das zum Einbringen der Prüfsubstanz in den Boden benötigte Wasser sollte berücksichtigt werden. Die erforderliche Menge an Calciumcarbonat kann in Abhängigkeit von den Eigenschaften der jeweiligen Charge des Sphagnumtorfs schwanken und sollte unmittelbar vor der Prüfung durch Messung von Teilproben bestimmt werden. Der gemischte künstliche Boden wird mindestens drei Tage bei Raumtemperatur gelagert, um den Säuregehalt ins Gleichgewicht zu bringen. Zur Bestimmung des pH-Werts und des maximalen Wasserrückhaltevermögens wird der trockene künstliche Boden einen Tag oder zwei Tage vor Beginn der Prüfung durch Zugabe von Deionat angefeuchtet, bis ungefähr die Hälfte des erforderlichen endgültigen Wassergehalts von 50 % bis 70 % des maximalen Wasserrückhaltevermögens erreicht ist.

Das Gesamtwasserrückhaltevermögen wird nach Anhang B bestimmt; der pH-Wert wird nach ISO 10390 bestimmt.

5.3 Futter

Jedem Behälter wird zu Beginn der Prüfung (Tag 0) und alle 7 Tage bis einschließlich Tag 21 als geeignete Nahrungsquelle granuliert, getrocknete Backhefe, die im Handel für den Hausgebrauch erhältlich ist, in einer ausreichenden Menge, z. B. 0,5 mg bis 1 mg, zugegeben.

5.4 Referenzsubstanz

Die EC_x einer Referenzsubstanz muss bestimmt werden, um sicherzustellen, dass die Prüfbedingungen des Laboratoriums angemessen sind, und um zu verifizieren, dass sich die Reaktion der Prüforganismen nicht im Laufe der Zeit verändert hat. Die Prüfung der Referenzsubstanz kann parallel zur Bestimmung der Toxizität jeder Analysenprobe bei einer Konzentration erfolgen, von der im Vorfeld in einer Dosis-Wirkungs-Untersuchung nachgewiesen werden muss, dass sie zu einer Wirkung von etwa 50 % führt. In diesem Fall sollte die Anzahl der Replikate die gleiche wie bei den Kontrollen sein. Alternativ wird die Referenzsubstanz 1 bis 2 Mal pro Jahr in einer Dosis-Wirkungs-Prüfung geprüft. Je nach gewähltem Untersuchungsdesign unterscheiden sich die Anzahl der Konzentrationen und der Replikate sowie der Faktor der Konzentrationsabstufungen (siehe 7.1.3), es sollte jedoch eine Reaktion von 10 % bis 90 % Wirkung erzielt

werden (Faktor der Konzentrationsabstufungen von 1,8). Eine geeignete Referenzsubstanz, die nachweislich die Reproduktionsleistung beeinflusst, ist Borsäure [14] [15] [19].

Die EC50 für Borsäure, basierend auf der Anzahl der juvenilen Milben, sollte in den Bereich zwischen 290 mg/kg (Trockenmasse) Boden und 410 mg/kg (Trockenmasse) Boden bei künstlichem Boden und in den Bereich zwischen 80 mg/kg (Trockenmasse) Boden und 120 mg/kg (Trockenmasse) Boden bei Freilandboden, einschließlich Standard-LUFA 2.2, fallen [15].

5.4.1 Borsäure (CAS-Nr. 10043-35-3), H₃BO₃ (99 %).

WARNUNG — Bei der Handhabung dieser Substanzen sollten geeignete Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um Verschlucken oder Hautkontakt zu vermeiden.

6 Geräte

Es werden die übliche Laborausrüstung und die folgenden Geräte verwendet.

6.1 Prüfbehälter aus Glas (z. B. Flachbodengläser) oder einem anderen, chemisch inerten Werkstoff, mit einem Fassungsvermögen von etwa 30 ml (etwa 2,6 cm Innendurchmesser) sollten verwendet werden. Die Prüfbehälter müssen abgedeckt werden, um das Entweichen von Milben zu verhindern, jedoch müssen sie einen Gasaustausch und einen Lichteinfall zulassen (z. B. durch eine perforierte lichtdurchlässige Abdeckung oder einen abnehmbaren Deckel, der eine wöchentliche Belüftung ermöglicht).

6.2 Gerät zum Bestimmen der Trockenmasse des Substrats nach ISO 11465.

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

6.4 Ausreichend genaue Waagen.

6.5 Geräte, die zum Messen von Temperatur, pH-Wert und Wassergehalt des Prüfsubstrats geeignet sind.

6.6 Vorrichtungen zur Extraktion von Milben durch Wärmebehandlung, wie in Anhang D beschrieben.

6.7 Prüfumgebung

6.7.1 Abgegrenzter räumlicher Bereich, dessen Temperatur sich auf (20 ± 2) °C regeln lässt.

6.7.2 Lichtquelle, die imstande ist, bei einem gesteuerten Licht-Dunkel-Zyklus zwischen 12 h : 12 h und 16 h : 8 h eine Beleuchtungsstärke von 400 lx bis 800 lx an der Substratoberfläche abzugeben.

7 Durchführung

7.1 Untersuchungsdesign

7.1.1 Allgemeines

Eine Probe des im Freiland entnommenen Prüfbodens kann bei einer einzigen Konzentration (in der Regel 100 %) geprüft werden oder in einer Prüfung mit mehreren Konzentrationen auf Toxizität untersucht werden, wobei eine Reihe von Verdünnungen hergestellt wird, indem abgemessene Mengen mit einem Kontrollboden gemischt werden. Bei einer Prüfung von Substanzen, die in den Boden eingebracht werden, wird eine Reihe von Konzentrationen hergestellt, indem Mengen der Prüfsubstanz mit einem Standardboden (z. B. künstlichem Boden) gemischt werden. Die Konzentrationen werden in Milligramm Prüfsubstanz je Kilogramm getrockneter Kontrollboden angegeben. Je nach Kenntnisstand hinsichtlich der relevanten

Ansprechwerte kann der Hauptprüfung ein Vorversuch vorausgehen. Jede Hauptprüfung mit mehreren Konzentrationen umfasst eine Reihe von Bodenmischungen (Aufbereitungen).

7.1.2 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs (Vorversuch)

Ein Vorversuch zur Ermittlung des Bereichs des Mischungsverhältnisses (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; wobei die Konzentrationen in Milligramm Prüfsubstanz pro Kilogramm getrockneter Kontrollboden angegeben werden), in dem eine Beeinträchtigung von *O. nitens* erfolgt, ist fakultativ. Die Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs wird mit einer im Vergleich zur Hauptprüfung verringerten Anzahl von Replikaten (z. B. mit 3 Replikaten) durchgeführt. Die Dauer der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs beträgt 28 d. Nach dieser Zeit werden die Mortalität der adulten Milben und die Anzahl der juvenilen Milben bestimmt. Anhand der Ergebnisse der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs sollte die EC50 für die Hemmung der Reproduktion geschätzt werden. Bei der Hauptprüfung sollte der Konzentrations-/Verdünnungsbereich vorzugsweise so gewählt werden, dass er Konzentrationen umfasst, die einen weiten Bereich abdecken, einschließlich einer niedrigen Konzentration, die keine Beeinträchtigungen hervorruft (ähnlich wie bei der Aufbereitung für die Negativkontrolle), und einer hohen Konzentration, die zu „vollen“ oder schwerwiegenden Wirkungen führt. Um den weiten Konzentrationsbereich zu erhalten und auch die wichtigen mittelschweren Wirkungen zu erzielen, könnte es erforderlich sein, zusätzliche Aufbereitungen zu verwenden, um den ausgewählten Bereich feiner zu unterteilen.

Wenn selbst bei zu 100 % kontaminiertem Boden oder bei Konzentrationen von 1 000 mg Prüfsubstanz/kg Standardboden (Trockenmasse) keine Wirkungen beobachtet werden, kann die Hauptprüfung als Grenzwertprüfung ausgestaltet werden.

7.1.3 Hauptprüfung

Die Ausgestaltung der Hauptprüfung hängt von den Zielen der Prüfung ab. Üblicherweise werden die Lebensraumeigenschaften von Proben eines Freilandbodens charakterisiert, indem die im zu prüfenden Boden festgestellten biologischen Wirkungen mit denen verglichen werden, die bei einem Referenzboden oder – falls ein solcher nicht verfügbar oder aufgrund von Toxizität oder atypischen physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht geeignet ist – bei einem Standardboden festgestellt werden. Die Ergebnisse für den Standardboden helfen, durch Kontaminanten hervorgerufene Wirkungen von nicht durch Kontaminanten hervorgerufene Wirkungen, die durch physikalisch-chemische Eigenschaften des Bodens verursacht werden, zu unterscheiden. Unabhängig davon, ob ein Referenzboden oder ein Standardboden für die statistischen Vergleiche verwendet wird, müssen die Ergebnisse vom Standardboden zur Beurteilung der Gültigkeit und Annehmbarkeit der Prüfung verwendet werden [24].

Ist für Charakterisierungszwecke ein Untersuchungsdesign erforderlich, das serielle Verdünnungsreihen einschließt, sind drei Ausgestaltungen möglich:

- 1) für den ECx-Ansatz müssen mindestens 7 Konzentrationen plus die Kontrollaufbereitung(en) verwendet werden, wobei mehr (d. h. ≥ 10 plus Kontrollen) empfohlen werden, um die Wahrscheinlichkeit des Einschachtelns jedes gesuchten Endpunkts zu verbessern [25]. Der Faktor der Konzentrationsabstufungen kann unterschiedlich sein, und zwar kleiner bei niedrigeren Konzentrationen, größer bei hohen Konzentrationen. Empfohlen werden fünf Replikate für jede Aufbereitung plus die Kontrollen;

ANMERKUNG Wird vor der Hauptprüfung eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs durchgeführt, können bei der Hauptprüfung weniger Konzentrationen (z. B. 6 oder 5) möglich sein, da mehr Informationen über den Wirkungskonzentrations-/Verdünnungsbereich zur Verfügung stehen werden.

- 2) für den NOEC-Hypothesenansatz sollten mindestens fünf Konzentrationen oder Prüfmischungen in einer geometrischen Reihe verwendet werden. Empfohlen werden fünf Replikate für jede Aufbereitung plus acht Kontrollen; oder

- 3) für den kombinierten Ansatz sollten 6 bis 8 Konzentrationen oder Prüfmischungen in einer geometrischen Reihe verwendet werden. Empfohlen werden fünf Replikate für jede Aufbereitung plus acht Kontrollen. Dieser kombinierte Ansatz ermöglicht eine Auswertung sowohl für NOER/NOEC- als auch für ERx/ECx.

Ungeachtet des gewählten Untersuchungsdesigns müssen sich die Prüfkonzentrationen um einen Faktor unterscheiden, der 2 nicht überschreitet.

Wenn bei der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs keine toxische Wirkung beobachtet wurde, kann eine Grenzwertprüfung ausreichend sein. Bei der Grenzwertprüfung brauchen nur die höchste Konzentration, die bei der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs geprüft wurde (d.h. 1 000 mg/kg), oder Prüfboden ohne jegliche Verdünnung (100 %) und der Kontrollansatz mit mindestens fünf Replikaten für jede Aufbereitung geprüft zu werden.

Zur Erleichterung einer Überprüfung der physikalisch-chemischen Analysen zu Beginn und am Ende der Prüfung wird die Verwendung zusätzlicher Behälter für jede Konzentration und für den Kontrollansatz empfohlen.

Jeder Prüfbehälter (Replikat) wird mit der Feuchtgutmasse befüllt, die dem gemessenen Volumen von etwa 20 ml bei optimaler Bodenfeuchte entspricht (siehe 7.2.1). Um eine leichte Migration der Milben sicherzustellen, sollte das Substrat im Prüfbehälter geglättet, jedoch nicht zusammengedrückt bzw. verdichtet werden.

7.2 Herstellung der Prüfmischung

7.2.1 Prüfung des kontaminierten Bodens

Der Prüfboden wird entsprechend dem ausgewählten Verdünnungsbereich mit dem Referenzboden oder dem Standardboden (entweder mit den Händen oder einem Handmischer) gründlich gemischt. Die Homogenität der Mischung wird visuell geprüft. Der Gesamtmasse des zu prüfenden Bodens und des Referenzbodens oder des Standardbodens muss in jedem Prüfbehälter die Feuchtgutmasse sein, die einem Volumen von etwa 20 ml entspricht (6.1). Die Prüfmischung muss so mit Deionat befeuchtet werden, dass 40 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens erreicht werden oder eine krümelige Textur (d.h. Klumpen von 2 mm bis 3 mm) erzielt wird, die, wie nach Anhang B bestimmt, optimal für die Prüfung ist. In einigen Fällen, z. B. bei der Prüfung von forstwirtschaftlichen Böden, Feuchtböden oder Abfallmaterial, können höhere oder niedrigere prozentuale Anteile erforderlich sein. Eine grobe Überprüfung der Bodenfeuchte kann durch leichtes Zusammendrücken des Bodens mit der Hand erfolgen; wenn der Feuchtegehalt optimal ist, sollten zwischen den Fingern kleine Wassertropfen austreten.

Bei jeder Prüfmischung (ein Behälter je Konzentration) wird zu Beginn und am Ende der Prüfung der pH-Wert nach ISO 10390 bestimmt (wenn saure oder basische Substanzen geprüft werden, wird der pH-Wert nicht eingestellt).

Die Replikate je Konzentration werden entsprechend dem gewählten Untersuchungsdesign gleichzeitig bearbeitet (7.1.3).

Bei Böden, die als unterschiedliche Horizonte entnommen wurden (z. B. boreale Böden oder Taiga-Böden), muss jeder Horizont separat in unabhängigen Hauptprüfungen geprüft werden [24].

WARNUNG — Kontaminierte Böden können unbekannte Gemische von giftigen, mutagenen oder anderweitig schädlichen Substanzen oder infektiösen Mikroorganismen enthalten. Durch Staub oder verdunstete Substanzen sowie durch Hautkontakt während der Handhabung und Inkubation können Arbeitsschutzrisiken entstehen.

7.2.2 Prüfung von Substanzen, die dem Prüfsubstrat zugegeben werden

Zur Herstellung der Analysenprobe wird Standardboden verwendet. Bei jedem Prüfbehälter (6.1) muss die Masse des verwendeten Substrats die Feuchtgutmasse sein, die einem Volumen von etwa 20 ml entspricht. Die Substanzen werden zu dem Prüfsubstrat gegeben und gründlich eingemischt.

Das Einbringen der Prüfsubstanzen erfolgt nach einem der Verfahren a), b) oder c), wie jeweils anwendbar:

a) wasserlösliche Substanz

- unmittelbar vor Beginn der Prüfung wird die Menge der Prüfsubstanz in Wasser oder in dem Teil des Wassers, der erforderlich ist, um die Bodenproben für die Replikate einer Konzentration übereinstimmend mit den Anforderungen nach 5.2.2. zu befeuchten, gelöst und gründlich mit dem Boden gemischt, bevor dieser in die Prüfbehälter eingebracht wird;

b) Substanzen, die in Wasser unlöslich, aber in organischen Lösemitteln löslich sind

- die Menge der Prüfsubstanz, die erforderlich ist, um die gewünschte Konzentration zu erhalten, wird in einem flüchtigen Lösemittel (wie etwa Aceton oder Hexan) gelöst und mit einem Anteil des Quarzsandes, der für künstlichen Boden benötigt wird, oder einem Anteil der Bodenprobe, falls ein Freiland-Standardboden verwendet wird, gemischt. Der Behälter wird unter eine Abzugshaube gestellt, bis das Lösemittel verdampft ist. Anschließend werden der restliche Boden und das restliche Wasser zugegeben, es wird gründlich gemischt, und das Gemisch wird in die Prüfbehälter eingefüllt.

ANMERKUNG Wenn Substanzen eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, können sie mittels Ultraschalldispersion, organischer Lösemittel, Emulgiermittel oder Dispergiermittel dispergiert werden. Werden solche Hilfsstoffe verwendet, enthalten alle Prüfkonzentrationen und alle zusätzlichen Kontrollen die gleiche Mindestmenge des Hilfsstoffs.

WARNUNG — Sofern Lösemitteldämpfe auftreten, sind geeignete Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um Gefahren durch Einatmen oder Explosion sowie Schäden an Absauganlagen, Pumpen usw. zu vermeiden.

c) Substanzen, die in Wasser und organischen Lösemitteln unlöslich sind

- bei einer Substanz, die in einem flüchtigen Lösemittel unlöslich ist, wird eine Mischung aus 10 g fein gemahlenem industriellen Quarzsand (siehe 5.2.2) oder Freiland-Standardboden und der Menge der zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderlichen Menge der Prüfsubstanz hergestellt. Dieses Gemisch wird zu dem restlichen Boden (d. h. zu dem künstlichen Boden bzw. dem Freiland-Standardboden) gegeben, das Wasser wird zugegeben und es wird gründlich gemischt, bevor die Mischung in die Prüfbehälter eingefüllt wird.

Die Konzentrationen für die Ermittlung der EC_x oder der NOEC/LOEC werden basierend auf den Ergebnissen der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs ausgewählt. Die Konzentrationsabstufungen werden so gewählt, dass sie sich um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden.

Substanzen, die in einen Referenz- oder Kontrollboden eingemischt werden, brauchen nicht in Konzentrationen von mehr als 1 000 mg/kg Masse des Referenz- oder Standardbodens geprüft zu werden.

Sämtliche Replikate je Konzentration und die erforderliche(n) Kontrolle(n) werden entsprechend dem gewählten Untersuchungsansatz gleichzeitig bearbeitet.

Bei jeder Prüfmischung (ein Behälter je Konzentration) wird zu Beginn und am Ende der Prüfung der pH-Wert nach ISO 10390 bestimmt.

7.2.3 Vorbereitung der Kontrollansatzbehälter

Der Kontrollansatzbehälter enthält den Kontrollboden, der mit Deionat so befeuchtet wurde, dass 40 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens erreicht werden oder eine krümelige Textur (d. h. Klumpen von 2 mm bis 3 mm) erzielt wird, die (wie nach Anhang B bestimmt) optimal für die Prüfung ist.

Es werden drei Kontrollansatzbehälter für die Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs und mindestens fünf Kontrollansatzbehälter für die Hauptprüfung bereitgestellt.

Die Kontrollansatzbehälter werden auf die gleiche Weise wie die Prüfbehälter vorbereitet. Erfordert die Vorbereitung der Prüfung die Verwendung eines Lösemittels (siehe 7.2.2), wird ein zusätzlicher Kontrollansatz verwendet, der mit Lösemittel, jedoch ohne die Prüfsubstanz zubereitet wird. Die Behälter werden wie in 6.1 angegeben abgedeckt.

7.3 Zugabe der Milben

In jedes Kontrollansatzgefäß und jedes Aufbereitungsgefäß werden fünfzehn alterssynchronisierte adulte Milben (siehe Anhang A) eingebracht. Die Prüforganismen sollten am Tag nach der Vorbereitung der Prüf- und Kontrollböden (d. h. nach Verdünnung eines Prüfbodens oder Einbringen des Prüfgegenstands und Vorbereitung der Replikatgefäße) zugegeben werden.

Die Milben werden von den alterssynchronisierten Kulturen mit einem feinen Pinsel vorsichtig auf ein Stück gefaltete Pappe, in einen kleinen Glasbehälter oder ein Wägeschiffchen (das zuvor gewaschen und getrocknet wurde, um den wachsartigen Film zu entfernen, mit dem Wägeschiffchen überzogen sind) übertragen [24]. Bevor sie in die Prüfbehälter umgesetzt werden, werden die Organismen gezählt und auf Verfärbungen oder Schädigungen überprüft, um sowohl die Kontrollmortalität zu reduzieren als auch systematische Versuchsfehler zu vermeiden.

Die Gefäße werden wie in 6.1 angegeben abgedeckt.

7.4 Prüfbedingungen und Messungen

Am Tag der Zugabe der Prüforganismen zum Boden (Tag 0) und alle 7 d bis einschließlich Tag 21 werden 0,5 mg bis 1 mg granuliert Hefe (siehe 5.3) gleichmäßig über die Oberfläche des feuchten Prüfbodens verteilt. Wenn der Nahrungsverbrauch in einem bestimmten Gefäß gering ist, wird die Fütterung reduziert, um sicherzustellen, dass den Organismen in jedem Gefäß die gleiche Menge Hefe zur Verfügung steht. Mindestens einmal wöchentlich oder bei Bedarf öfter (≥ 2 Mal wöchentlich) werden die Deckel von jedem Prüfgefäß für kurze Zeit entfernt, um eine Belüftung zu ermöglichen. Zu diesem Zeitpunkt sollten Beobachtungen und Aufzeichnungen hinsichtlich des Aussehens des Bodens (Wachstum von Bakterien oder Pilzen), der Fraßaktivität sowie des Vorhandenseins und der Menge nicht verzehrter Nahrung gemacht werden.

Die Temperatur sollte mindestens täglich aufgezeichnet und gegebenenfalls angepasst werden. Der pH-Wert (7.2.1 und 7.2.2) und der Wassergehalt (nach ISO 11465) des Bodens, die für jede Aufbereitung repräsentativ sind, müssen zu Beginn und am Ende der Prüfung gemessen und aufgezeichnet werden. Des Weiteren wird empfohlen, zu Beginn und am Ende der Prüfung die Leitfähigkeit (siehe ISO 11265) zu messen, wenn zu erwarten ist, dass der Prüfboden einen hohen Salzgehalt aufweist.

Der Wassergehalt des Bodensubstrats in den Prüfgefäßen wird während der gesamten Prüfung beibehalten, indem die sichtbare „Feuchte“ (siehe 7.2.1) jedes Gefäßes im Rahmen der wöchentlichen Beobachtungen untersucht wird. Boden, der zu trocken erscheint, sollte mit einem Prüfwassertropfer befeuchtet werden, wobei darauf zu achten ist, dass der Boden nicht übermäßig hydratisiert wird. Alternativ kann der Wassergehalt des Bodensubstrats während der gesamten Prüfung durch Wägen und gegebenenfalls periodisches Nachwässern der Prüfgefäße (z. B. einmal wöchentlich) aufrechterhalten werden. Verluste werden bei Bedarf mit Deionat aufgefüllt. Während der Prüfung sollte der Feuchtegehalt nicht um mehr als

10 % vom Ausgangswert abweichen. Wenn saure oder basische Substanzen geprüft werden, wird der pH-Wert nicht eingestellt.

7.5 Bestimmung der Überlebensrate der Imagines und der Reproduktionsleistung

Am Tag 28 werden die lebenden Milben (Imagines und Nachkommen) durch Wärme-/Licht-Anwendung aus dem Boden ausgetrieben (siehe Anhang D). Die juvenilen Formen (d. h. Larven, Protonymphen, Deutonymphen und Tritonymphen) und die Imagines werden separat gezählt. Alle Organismen, lebend oder tot, werden ausgezählt und dokumentiert. Alle adulten Milben, die zu diesem Zeitpunkt nicht gefunden werden, sind als tot zu erfassen, wobei davon ausgegangen wird, dass diese Milben vor der Datenerhebung gestorben sind und sich zersetzt haben. Die Parameter des Verfahrens zur Extraktion von Bodenorganismen durch Wärmebehandlung (z. B. Wattzahl der Glühlampe, Höhe über dem Boden usw.) müssen so optimiert werden, dass lebende Organismen sich erfolgreich durch den Boden zu einem Sammelbehälter bewegen können, ohne dabei auszutrocknen. Außerdem sollte der Temperaturgradient so optimiert werden, dass ein effektiver Temperatur- und Feuchtigkeitsgradient entsteht, der die Bewegung der Organismen ermöglicht. Dies sollte zwischen 48 h und 120 h erfolgen (siehe Anhang D). Die Effizienz der Extraktion durch Wärmebehandlung sollte ein- oder zweimal jährlich in Kontrollansätzen mit bekannten Anzahlen von Imagines und juvenilen Formen validiert werden. Für alle Entwicklungsstadien zusammen sollte die Effizienz im Durchschnitt $\geq 90\%$ betragen (siehe Anhang D). Die Zählungen der Imagines und der juvenilen Formen werden nicht mit Blick auf die Erfüllung des Wirksamkeitskriteriums angepasst.

Alle beobachteten Unterschiede zwischen dem Verhalten und der Morphologie der Milben in den Gefäßen mit Kontrollansatz und den Gefäßen mit Aufbereitungen sollten aufgezeichnet werden.

Imagines lassen sich durch ihren deutlich größeren Körper und eine dunklere Färbung leicht von juvenilen Formen unterscheiden (siehe Anhang A.3). Eine Milbe wird als tot angesehen, wenn sich keines ihrer Körperteile mehr bewegt. Bei toten *O. nitens* sind die Beine tendenziell unter dem Körper eingerollt, und sie können, was jedoch in der Regel nicht der Fall ist, eine andere Farbe aufweisen. Es sollte darauf geachtet werden, tote Individuen nicht mit abgeworfenen Larvenhäuten zu verwechseln; Letztere sind durchscheinend und kollabiert.

Die Extraktionseffizienz kann nachgewiesen werden, indem die in der Aufbereitung für die Negativkontrolle vorhandenen Imagines und juvenilen Formen ausgezählt werden. Die Extraktionseffizienz kann beurteilt werden, indem die nach Abschluss der Extraktion durch Wärmebehandlung im Boden verbliebenen Individuen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Milben ausgezählt werden. Der Boden, an dem die Extraktion durch Wärmebehandlung durchgeführt wurde, kann mittels herkömmlicher Flotationsmethoden überprüft werden. Ist das Kriterium durchweg erfüllt, darf der Boden, an dem die Extraktion durch Wärmebehandlung durchgeführt wurde, ordnungsgemäß entsorgt werden. Andernfalls muss mit allen weiteren Aufbereitungen in einer ähnlichen Weise verfahren werden.

8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

8.1 Berechnung

Für jede Verdünnung oder Konzentration werden nach einem Zeitraum von 28 Tagen die prozentuale Mortalität der Imagines und die Anzahl der produzierten Nachkommen bestimmt.

8.2 Angabe der Ergebnisse

Es sollte eine graphische Darstellung der Mittelwerte der Endpunkte einschließlich der Standardabweichung der Messwerte, aufgetragen gegen den Prüfboden (die Prüfböden), den Kontrollboden (die Kontrollböden) oder die ausgewählte Reihe von Prüfmischungsverhältnissen, erstellt werden. Dieser Vergleich oder diese Kurve vermittelt einen Eindruck von der Art der Wirkungen und ihren Ausmaßen. Das Mischungsverhältnis wird auf der Grundlage der Bodentrockenmasse angegeben.

Falls Verdünnungs- oder Konzentrationsreihen hergestellt wurden,

- werden für den ECx-Ansatz die geprüfte Bodenmischung in %, auf der Grundlage der Trockenmasse, oder in Milligramm pro Kilogramm getrocknetes Bodensubstrat; die mittlere prozentuale Verdünnung des kontaminierten Bodens oder die mittlere Konzentration der Prüfsubstanz, die innerhalb des Prüfzeitraums zu einer Verringerung der Anzahl der juvenilen Milben auf 50 % (EC50) im Vergleich zur Kontrolle führte, angegeben [25];
- wird für den NOEC-Ansatz das Bodenmischungsverhältnis unmittelbar unterhalb der LOEC oder der höchsten geprüften Konzentration/Rate einer Prüfsubstanz angegeben, das im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante letale oder andere Wirkung, wie etwa auf die Reproduktionsleistung, hat ($p < 0,05$).

9 Gültigkeit der Prüfung

Die Ergebnisse werden als gültig angesehen, wenn

- die durchschnittliche prozentuale Mortalität der Imagines im Kontrollansatz (in den Kontrollansätzen) am Ende der Prüfung ≤ 30 % ist;
- die durchschnittliche Anzahl lebender juveniler Milben in Kontrollansatzgefäßen am Ende der Prüfung ≥ 30 ist;
- der Variationskoeffizient der Reproduktionsleistung im Kontrollansatz sollte 40 % nicht überschreiten.

ANMERKUNG Die Validitätskriterien für dieses Verfahren basieren auf einer Prüfung von 13 Bodentypen und -horizonten (land- und forstwirtschaftliche Böden) [24] und den Ergebnissen internationaler Vergleichsprüfungen durch Prüflaboratorien (siehe Anhang E und [15]).

10 Statistische Analyse

10.1 Allgemeines

Obwohl mit diesem Verfahren in erster Linie subletale Endpunkte bestimmt werden (z. B. die Reproduktionsleistung infolge von quantitativen Wirkungen durch Zählen der juvenilen Milben), können am Ende der Prüfung (Tag 28) auch quantale Wirkungen (z. B. Überleben von Imagines) bestimmt werden.

ANMERKUNG Die hier gegebene Anleitung für die statistische Auswertung von Prüfergebnissen zielen darauf ab, den Untersuchenden auf Probleme aufmerksam zu machen, die aufgrund eines gewählten Untersuchungsdesigns auftreten können. Computerprogramme schützen nicht notwendigerweise vor Regelverstößen, die fehlerhafte Analysen verursachen können. Es wird dringend empfohlen, in speziellen Leitfäden nach weiteren Informationen zu suchen (z. B. wie in [25] enthalten) oder sich an einen Statistiker zu wenden.

10.2 Prüfungen mit nur einer Konzentration

Für quantitative Prüfungen mit nur einer Konzentration (z. B. der Wirkungen auf die Reproduktionsleistung) gibt es unterschiedliche statistische Verfahren. Bei einer Probenahme an mehreren Orten mit Freilandwiederholungen kann die Varianzanalyse (ANOVA) ein erster Schritt sein, wenn die Ergebnisse brauchbar sind. Wenn die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied gibt, verworfen wurde, dann kann die Analyse mit einem von mehreren Mehrfachvergleichstests fortgesetzt werden [25].

Ein Beispiel für eine mit nur einer Konzentration erfolgende Prüfung auf quantitative Wirkungen kann die Zählung der juvenilen Milben sein, als Endpunkt der Wirkungen auf die Reproduktionsleistung nach Exposition einer Probe von unverdünntem kontaminiertem Boden im Vergleich zur Anzahl der Nachkommen, die einem Referenz- oder Standardboden ausgesetzt werden. Wurden dabei nur eine Mischung und eine Kontrollprobe ohne Replikate geprüft, können die Ergebnisse nicht mittels statistischer

Tests verglichen werden. Bei einer quantitativen Prüfung mit Replikaten für den Prüfboden und für den Kontrollboden ist ein üblicher *t*-Test für die statistische Analyse geeignet.

Üblicherweise wird für die statistische Auswertung der Signifikanz quantitativer Befunde (z. B. Reproduktionsleistung) bei Bodentoxizitätsprüfungen eine Varianzanalyse (ANOVA, en: analysis of variance) angewendet, die Mehrfachvergleiche der Endpunktdaten, abgeleitet für unverdünnte zu prüfende Böden sowie für Replikate von Freilandböden von mehr als einem Probenahmeort, einschließt. Es handelt sich dabei um ein Konzept der Hypothesentestung, das nicht unerheblichen Schwächen unterliegt [25]. Die parametrischen Analysen (z. B. ANOVA und Mehrfachvergleiche) solcher Daten setzen voraus, dass die Daten einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen, dass die Aufbereitungen unabhängig voneinander sind und dass die Varianz über die verschiedenen Aufbereitungen hinweg gleich ist. Es muss geprüft werden, ob diese Voraussetzungen erfüllt sind. Wenn die Daten diesen Voraussetzungen genügen, darf die Analyse durchgeführt werden. Falls nicht, dürfen die Daten transformiert und erneut überprüft werden. Da parametrische Test hinsichtlich moderater Abweichungen von der Normalverteilung und der Varianzgleichheit einigermaßen robust sind, sollte die parametrische Analyse durchgeführt werden, auch wenn nach der Transformation eine moderate Nichtkonformität fortbesteht [25]. Daten, die die Voraussetzungen für die Tests nicht erfüllen, dürfen transformiert werden, um die Anforderungen zu erfüllen. Wenn weder die ursprünglichen noch die transformierten Daten aufgrund der Verteilung der Daten die Voraussetzungen für die Tests erfüllen, dann muss die Analyse mit nichtparametrischen Verfahren durchgeführt werden.

10.3 Prüfungen mit mehreren Konzentrationen

10.3.1 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs

Wenn eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung offensichtlich ist, können die EC_x-Werte mit Regressionsmethoden wie der logistischen Regressionsfunktion geschätzt werden und die LC_x-Werte können mittels Probit-Analyse geschätzt werden. In anderen Fällen könnte der Wirkungsbereich durch Fachkenntnis bestimmt werden.

10.3.2 Hauptprüfung

Die quantalen Mortalitätsdaten für eine bestimmte Expositionsdauer (d. h. 28 d) können verwendet werden, um die entsprechenden Punktschätzungen (LC_x) bei Vertrauensgrenzen von 95 % zu berechnen (sofern die Daten dies zulassen). Die Optimierung der Berechnung der LC_x basiert auf der Anzahl der beobachteten Teilwirkungen [25]. Für die statistische Schätzung eines Prüfungsendpunkts anhand von quantalen Mortalitätsdaten stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Für weitere Hinweise siehe [25].

Als bester quantitativer Endpunkt wird eine Punktschätzung (EC_x-Ansatz) empfohlen. Das stellt im Vergleich zur Kontrolle üblicherweise einen gewissen Grad an Leistungsverminderung dar. Häufig werden für statistische Analysen lineare und nicht lineare Regressionsverfahren eingesetzt. Bei der Auswahl geeigneter mathematischer Modelle sollten die Anwender in der Lage sein zu verstehen, wie die Schätzungen zustande kommen.

Üblicherweise wird zur Identifizierung der Verdünnungen (Konzentrationen) mit signifikanten Wirkungen im Vergleich zur Kontrolle eine Hypothesentestung (NOEC-Ansatz) angewendet. Da dieses Verfahren viele Schwächen aufweist, empfiehlt sich seine Anwendung nicht [25]. Deshalb werden in Fällen, in denen verschiedene Verdünnungen (Konzentrationen) jeder Probe von im Freiland entnommenem Boden mit Negativkontrollboden geprüft werden, die Daten vorzugsweise mithilfe des EC_x-Ansatzes analysiert. Wenn jedoch die Gesetzgebung NOEC/LOEC-Schätzungen verlangt, dann können diese Werte zusätzlich zu den Endpunkten der Punktschätzung berechnet werden.

— EC_x-Ansatz (Wirkungskonzentrationsansatz)

Der EC_x-Ansatz kann nur verwendet werden, wenn eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt wird. Nach Möglichkeit sollte der R²-Wert (wobei R der Regressionskoeffizient ist) 0,7 oder höher sein, und

die verwendeten Prüfmischungen sollten einen Wirkungsbereich von 20 % bis 80 % abdecken. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, sind Fachkenntnisse für die Interpretation der Prüfergebnisse erforderlich.

Zur Berechnung eines EC_x-Werts werden die Mittelwerte der Aufbereitungen für eine Regressionsanalyse (z. B. lineare oder nicht lineare Regression) verwendet, nachdem eine geeignete Dosis-Wirkungs-Funktion ermittelt wurde. Eine gewünschte EC_x wird durch Einsetzen eines Werts, der $x\%$ des Mittelwerts der Kontrolle entspricht, in die durch die Regressionsanalyse erhaltene Gleichung ermittelt. Da die EC₅₀-Werte verglichen mit geringeren Wirkungskonzentrationen (z. B. EC₂₀ oder EC₁₀) engere Vertrauensgrenzen haben, wird eine Bestimmung der EC₅₀-Werte empfohlen.

Bei dem NOEC-Ansatz muss eine statistische Analyse durchgeführt werden, um die Normalverteilung der Daten (z. B. mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test) und die Homogenität der Varianzen (z. B. mit dem Cochran-Test) zu beurteilen. Bei normalverteilten und homogenen Daten sollte eine geeignete statistische Analyse (z. B. „One-Way Analysis of Variance“ (ANOVA)) gefolgt von einem einseitigen Dunnett-Test ($\alpha = 0,05$) durchgeführt werden. Für den Fall, dass die Voraussetzungen hinsichtlich Normalverteilung und/oder Homogenität nicht erfüllt sind, wird empfohlen abzuschätzen, ob eine geeignete Transformation der Daten das Problem lösen kann. Anderenfalls können nichtparametrische Verfahren (z. B. der U-Test nach Mann und Whitney oder der U-Test nach Bonferroni) verwendet werden.

Wenn eine Grenzwertprüfung durchgeführt worden ist und die Voraussetzungen (Normalverteilung, Homogenität) für parametrische Testverfahren erfüllt sind, darf der Student-*t*-Test verwendet werden, andernfalls der *t*-Test mit ungleichen Varianzen (z. B. Welch-*t*-Test) oder ein nichtparametrischer Test, wie etwa der U-Test nach Mann und Whitney.

In jedem Fall müssen die Ergebnisse der statistischen Auswertung biologisch interpretiert werden.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- a) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 23266:2020;
- b) die Ergebnisse, angegeben wie in 8.2 beschrieben;
- c) eine detaillierte Beschreibung der Prüfsubstanz und Angaben zu physikalischen und chemischen Eigenschaften, wenn diese für die Auswertung des Prüfergebnisses hilfreich sind;
- d) die Herkunft des Freilandbodens, der als Kontroll- und Verdünnungsboden verwendet wurde (falls zutreffend);
- e) die vollständige Beschreibung des verwendeten biologischen Materials (Art, Alter, Zuchtbedingungen, Bezugsquelle);
- f) das Verfahren zur Herstellung der Analysenprobe, einschließlich einer Angabe der Hilfsstoffe, die bei einer gering/nicht wasserlöslichen Substanz verwendet wurden;
- g) die Bezeichnung der Referenzsubstanz und die bei ihrer Verwendung erzielten Ergebnisse;
- h) die detaillierten Bedingungen der Prüfumgebung;
- i) eine Tabelle, die für jede Konzentration und für die Kontrolle(n) die prozentuale Mortalität der Imagines angibt;
- j) die Anzahl der toten bzw. nicht wiedergefundenen Imagines und die Anzahl der Nachkommen je Prüfbehälter am Ende der Prüfung;