

DIN EN ISO 23611-4



ICS 13.080.05; 13.080.30

EntwurfEinsprüche bis 2021-12-01
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 23611-4:2011-09

**Bodenbeschaffenheit –
Probenahme von Wirbellosen im Boden –
Teil 4: Probenahme, Extraktion und Bestimmung von Boden bewohnenden
Nematoden (ISO/DIS 23611-4:2021);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23611-4:2021**

Soil quality –
Sampling of soil invertebrates –
Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes
(ISO/DIS 23611-4:2021);
German and English version prEN ISO 23611-4:2021

Qualité du sol –
Prélèvement des invertébrés du sol –
Partie 4: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol
(ISO/DIS 23611-4:2021);
Version allemande et anglaise prEN ISO 23611-4:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-10-01 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 Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 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.

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Gesamtumfang 70 Seiten

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 23611-4:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 137 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung (Koordinierung ISO/TC 190; ISO/TC 275, CEN/TC 308, CEN/TC 444, CEN/SABE/ENV)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Die Normenreihe ISO 23611 besteht unter dem Haupttitel *Soil quality — Sampling of soil invertebrates* aus den folgenden Teilen:

- *Part 1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms*
- *Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina)*
- *Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids*
- *Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes*
- *Part 5: Sampling and extraction of soil macro-invertebrates*
- *Part 6: Guidance for the design of sampling programmes with soil invertebrates*

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

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 10390:2005	siehe	DIN ISO 10390:2005-12
ISO 10694:1995	siehe	DIN ISO 10694:1996-08
ISO 11268-3:1999	siehe	DIN ISO 11268-3:2000-03
ISO 11272:1998	siehe	DIN ISO 11272:2001-01
ISO 11274:1998	siehe	DIN ISO 11274:2001-01
ISO 11277:1998	siehe	DIN ISO 11277:2002-08
ISO 11461:2001	siehe	DIN ISO 11461:2002-05
ISO 11465:1993	siehe	DIN ISO 11465:1996-12
ISO 18400-101	siehe	DIN ISO 18400-101

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 23611-4:2011-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) es wurden Beispiele von Nematoden-Monitoringprogrammen (einschließlich der Darstellung ihrer Ergebnisse) als informativer Anhang hinzugefügt;
- b) redaktionelle Überarbeitung der Norm.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 10390:2005-12, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes (ISO 10390:2005)*

DIN ISO 10694:1996-08, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse) (ISO 10694:1995)*

DIN ISO 11268-3:2000-03, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 3: Anleitung für die Bestimmung von Wirkungen unter Freilandbedingungen (ISO 11268-3:1999)*

DIN ISO 11272:2001-01, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Trockenrohdichte (ISO 11272:1998)*

DIN ISO 11274:2001-01, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren (ISO 11274:1998)*

DIN ISO 11277:2002-08, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren mittels Siebung und Sedimentation (ISO 11277:1998 + ISO 11277:1998 Corrigendum 1:2002)*

DIN ISO 11461:2002-05, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wassergehalts des Bodens als Volumenanteil mittels Stechzylinder — Gravimetrisches Verfahren (ISO 11461:2001)*

DIN ISO 11465:1996-12, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse — Gravimetrisches Verfahren (ISO 11465:1993)*

DIN ISO 18400-101, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 101: Grundzüge der Vorbereitung und Anwendung eines Probenahmeplans (ISO 18400-101:2017)*

<i>Titel de:</i>	Bodenbeschaffenheit — Probenahme von Wirbellosen im Boden — Teil 4: Probenahme, Extraktion und Bestimmung von Boden bewohnenden Nematoden (ISO/DIS 23611-4:2021)
<i>Titel en:</i>	Soil quality — Sampling of soil invertebrates — Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes (ISO/DIS 23611-4:2021)
<i>Titel fr:</i>	Qualité du sol — Prélèvement des invertébrés du sol — Partie 4: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol (ISO/DIS 23611-4:2021)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	9
6 Werkstoffe und Prüfeinrichtung	9
6.1 Probenahme	9
6.2 Extraktion	9
6.3 Auszählen	10
6.4 Fixierung und Vorbereitung der Massen-Objektträger	10
6.5 Bestimmung	10
7 Durchführung	10
7.1 Allgemeines	10
7.2 Probenahme	11
7.3 Extraktion	12
7.4 Auszählen	13
7.5 Fixierung und Herstellung der Massen-Objektträger	14
7.6 Bestimmung	14
8 Auswertung der Ergebnisse	15
9 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Bilder zur Ausrüstung und zu den Verfahren bei der nematologischen Forschung	17
Anhang B (informativ) Angaben zur Verfügbarkeit des Oostenbrink-Elutriators	21
Anhang C (informativ) Angaben zum Extraktionsverfahren mit Baermann-Trichter/Schale	24
Anhang D (informativ) Beispiele für den von wirbellosen Bodenlebewesen in Bodenüberwachungsprogrammen (einschließlich Darstellung der Ergebnisse)	26
Literaturhinweise	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 23611-4:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 137 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 23611-4:2021 wurde von CEN als prEN ISO 23611-4:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 23611-4:2007), die technisch überarbeitet wurde. Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Beispiele von Nematoden-Monitoringprogrammen (einschließlich der Darstellung ihrer Ergebnisse) wurden als informativer Anhang hinzugefügt.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 23611 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

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

Dieses Dokument wurde erarbeitet, um dem wachsenden Bedarf nach Normung bodenzoologischer Feldverfahren gerecht zu werden. Derartige Verfahren, die in erster Linie bei der Probenahme, Extraktion und Handhabung von Wirbellosen im Boden Anwendung finden, werden für folgende Zwecke benötigt:

- biologische Klassifizierung von Böden, einschließlich der Beurteilung der Bodenqualität [36] [41] [56];
- terrestrische Bioindikation und Langzeitbeobachtung [24] [27] [30] [49];
- Bewertung der Wirkungen von Chemikalien auf Bodentiere (ISO 11268-3 [33]).

Die für diese Zwecke benötigten Daten werden durch genormte Verfahren gewonnen, da sie die Grundlage für weit reichende Entscheidungen (z. B. ob ein bestimmter Standort saniert werden sollte oder nicht) bilden können. Tatsächlich ist der Mangel an derartigen genormten Verfahren einer der wichtigsten Gründe dafür, dass Bioklassifizierungen und Biobeurteilungen terrestrischer Habitats (d. h. von Bodenhabitats) im Vergleich zu aquatischen Standorten bisher relativ selten durchgeführt wurden.

Nematoden stellen einen wichtigen und großen Teil der Bodenfauna dar. Einige Autoren schätzen, dass diese Gruppe die wahrscheinlich am stärksten dominierende Gruppe der mehrzelligen Organismen (Metazoa) auf der Erde bildet [51]. Nematoden treten von der Antarktis bis zu den Tropen und von Tiefseesedimenten bis hin zu Bergregionen auf. Sie sind an allen Orten aktiv, an denen sie ausreichend Wasser und organisches Material vorfinden. Die Artenvielfalt und funktionelle Vielfalt ist beeindruckend [14]. Nematoden sind allgemein als Parasiten bei Tieren und Pflanzen bekannt; der überwiegende Teil der Nematodenfauna beteiligt sich jedoch an Abbauprozessen, in dem er sich von Bakterien und Pilzen ernährt.

Nematoden treten in fast jeder Bodenprobe in großer Anzahl ($0,2 - 9 \times 10^6 \text{ m}^{-2}$) und mit einer großen Artenvielfalt (10 bis 100 Arten) auf [12]. Darüber hinaus besteht ein umfassendes ökologisches Spektrum an Ernährungstypen und Beziehungen innerhalb des Nahrungsnetzes zwischen den Nematoden, z. B. Bakterivore, Fungivore, Herbivore, Prädatoren und Omnivore [56] [57]. Diese Faktoren machen die Gruppe so geeignet als Indikatoren für die ökologische Bodenbeschaffenheit [55]; dennoch ist aus Gründen des Vergleichs und der Kombination der Ergebnisse eine Normung der Verfahren dringend erforderlich.

In den vergangenen 100 Jahren hat sich die Nematologie in Hinblick auf Landwirtschaft, Probenahmen zwecks Beratung und phytosanitären Bestimmungen stark weiterentwickelt, da einige terrestrische Nematoden große Schäden an Nutzpflanzen verursachen. Bezüglich der Verfahren existieren in verschiedenen Teilen der Erde unterschiedliche „Schulen“, die jeweils ihre eigene Geschichte sowie ihre jeweiligen praktischen Vor- und Nachteile aufweisen. Ein umfassender Überblick ist bei Oostenbrink [14] und Southey [47] [48] zu finden. Die in jüngerer Zeit beschriebenen Verfahren (oder Varianten) wurden häufig aufgrund eines besonderen Interesses an bestimmten pflanzenparasitischen Arten entwickelt. In den letzten 20 Jahren wurden neue Methoden entwickelt, die eine DNA-basierte taxonomische Identifizierung von Nematodenarten ermöglichen [20] [33] [53]. Dadurch wird die taxonomische Analyse von Nematoden für eine breitere Gemeinschaft von Nichtfachleuten zugänglich.

Seit Bongers [16] den Maturity-Index (Reifeindex) einführte, hat sich der Einsatz von Nematoden bei der Bioindikation in Bezug auf die Bodenbeschaffenheit rasch verstärkt [55]. Heutzutage werden Nematoden in zahlreichen Ländern auf der ganzen Welt für die ökologische Bodenforschung und -überwachung verwendet. Überwachungsaktivitäten stellen besondere Anforderungen an die Methodik. So ist es beispielsweise erforderlich, routinemäßig eine große Anzahl von Bodenproben zu verarbeiten und dabei die Kosten auf einem angemessenen Niveau zu halten. Einige der ursprünglich für die Probenahme zu Beratungszwecken in der Landwirtschaft entwickelten Verfahren eignen sich sehr gut auch für die ökologische Forschung. Sie bilden die Grundlage der in diesem Dokument beschriebenen spezifischen Varianten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Probenahme und Handhabung frei lebender Nematoden aus terrestrischen Freilandböden fest, das als eine Voraussetzung für die Verwendung dieser Tiere als Bioindikatoren (z. B. zur Beurteilung der Beschaffenheit eines Bodens als Lebensraum für Organismen) dient.

Dieses Dokument wird angewendet für alle terrestrischen Biotope, in denen Nematoden vorkommen. Die allgemeine Planung der Probenahme für Freilanduntersuchungen ist in ISO 18400-101 festgelegt.

Dieses Dokument ist wegen der Unterschiede in der Probenmatrix (z. B. Wassersäule) nicht auf aquatische Nematoden anwendbar. Methoden für einige andere Gruppen von Bodenorganismen wie Regenwürmer, Collembolen, Enchytraeiden oder Makroinvertebraten werden in ISO 23611-1, ISO 23611-2, ISO 23611-3 und ISO 23611-5 behandelt.

Bei den Nematoden, die mit dem vorgeschlagenen Verfahren charakterisiert werden, handelt es sich um alle im Boden vorkommenden, frei lebenden Formen von Nematoden. Sie umfassen Nematoden, die sich nicht von Pflanzen ernähren, sowie auch ektoparasitäre pflanzenfressende Nematoden und frei lebende Stadien endoparasitärer Nematoden. Die mengenmäßige Bestimmung obligater pflanzenfressender Nematoden in Wurzeln erfordert besondere Verfahren.

ANMERKUNG Grundlegende Informationen zur Ökologie von Nematoden und ihrer Verwendung als Bioindikatoren sind im Literaturverzeichnis zu finden.

Dieses Dokument behandelt nicht die Charakterisierung des Standortes nach bodenkundlichen Gesichtspunkten, die für die Probenahme von Wirbellosen im Boden nachdrücklich empfohlen wird, da eine enge Beziehung zwischen dem Vorkommen bestimmter Arten und abiotischen Faktoren besteht. ISO 10390, ISO 10694, ISO 11272, ISO 11274, ISO 11277, ISO 11461 und ISO 11465 behandeln zur Bestimmung des pH-Wertes, der Korngrößenverteilung, des C/N-Verhältnisses, des Gehaltes an organischem Kohlenstoff und des Wasserrückhaltevermögens geeignetere Verfahren.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

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 <https://www.electropedia.org/>

3.1 Nematode
kleiner, unsegmentierter, frei lebender Wurm (mit einer Länge bis zu einigen Millimetern), der zur Klasse der Nematoda gehört

Anmerkung 1 zum Begriff: Nematoden ohne Boden bewohnende Stadien sind in diesem Kontext nicht abgedeckt.

3.2

Standort

Untersuchungsgebiet oder -parzelle, das/die (unter anderem) auf der Grundlage der Zusammensetzung der Nematodenfauna charakterisiert wird

3.3

Sammelprobe

zusammengesetzte Bodenprobe aus vielen kleinen Bodenkernen, die dazu dient, einen Eindruck von der durchschnittlichen Zusammensetzung der Nematodenfauna zu erhalten

3.4

Bodenprobenehmer

Werkzeug zur Entnahme von Bodenmaterial auf rasche und genormte Weise

3.5

Oostenbrink-Elutriator¹

Metalltrichter mit einem aufwärts gerichteten Wasserstrom, der dazu dient, die Nematoden von größeren Bodenpartikeln zu trennen

Siehe Bild A.3.

3.6

Massen-Objektträger

mikroskopischer Objektträger, auf dem zum Zwecke der Artenbestimmung 300 bis 400 Nematoden eingebettet sind

3.7

Bestimmung

Bestimmung von Art, Gattung oder Familie eines Individuums auf der Grundlage morphologischer Merkmale (Mundwerkzeuge, Geschlechtsorgane, Körperverhältnis) unter Anwendung eines Bestimmungsschlüssels

3.8

Kolonialisierer-Dauersiedler-Skala (c-p-Skala), en: colonizer-persister (cp) scale
ökologische Klassifizierung von Nematoden, nach Bongers [16] [17]

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Prinzip verhält sich analog zu den r-K-Lebensstrategien im Verlauf einer Sukzession zwischen denen nach den Grundlagen der Ökologie unterschieden wird. Familien von Nematoden, die sich nicht von Pflanzen ernähren, werden einer der fünf c-p-Gruppen zugeordnet. Das ist auch die Grundlage für die Berechnung des Maturity-Index.

4 Kurzbeschreibung

Die Nematoden werden mit einer kleinen zylindrischen Hülse (Durchmesser: etwa 2 cm; Länge: etwa 10 cm) oder einem Stangenbohrer (siehe Bild A.2) in Bodenproben gesammelt. Zu Überwachungszwecken werden die Bodenproben zu einer Sammelprobe von einer homogenen Fläche zusammengefasst. Die Gesamtzahl der zu entnehmenden Proben ist von der Größe der untersuchten Fläche und deren Homogenität (z. B. Pedologie und Nutzung, Kulturpflanzen) abhängig. Die einzelnen Proben können vor Ort in genormten Kunststofftüten oder Kunststoffeimern zusammengetragen werden. Die zusammengesetzte Sammelprobe ist für die direkte

1 Oostenbrink-Elutriator ist die Herstellerbezeichnung des Produktes, z. B. geliefert von der Fa. MEKU Erich Pollähne GmbH (<https://www.meku-pollaehne.de/Nematologie/Oostenbrink-Elutriator/oostenbrink-elutriator.html>). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Untersuchung zu groß und wird daher gemischt und in Teilproben unterteilt. Vor Ort und während des Transports zum Labor sind die Bodenproben gegen starke Temperaturschwankungen, Wasserverlust und intensive mechanische Störungen zu schützen. Sie können maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

ANMERKUNG 1 Das vorstehend beschriebene Probenahmeverfahren wurde aus dem „Holländischen Verfahren“ [48] zur Bestimmung des Befalls eines Feldes mit Kartoffelzystennematoden abgeleitet und wird seit vielen Jahren in verschiedenen europäischen Ländern angewendet.

Das Trichterverfahren nach Oostenbrink wird für die routinemäßige Extraktion von Bodenproben empfohlen, z. B. im Rahmen eines Überwachungsnetzwerkes. Das Oostenbrink-Verfahren ist nicht das einfachste Verfahren für die Anwendung unter allen möglichen Umständen. Dennoch weist es zahlreiche Vorteile auf: Es ist hoch genormt und konstant in Hinblick auf die Extraktionseffizienz. Das Nasstrichterverfahren nach Oostenbrink kombiniert drei grundlegende Verfahrensweisen zur Trennung der Nematoden vom Boden: Waschen, Sieben, aktive Bewegung. Daher werden mit diesem Verfahren bessere Ergebnisse erzielt als mit jeweils einem der grundlegenden Verfahren allein. Weitere Vorteile sind im Folgenden angegeben:

- relativ große Bodenproben jedes Bodentyps können gleichzeitig behandelt werden (100 g bis 500 g);
- saubere Nematodensuspensionen;
- Isolierung der meisten lebenden und aktiven Nematoden;
- es bestehen bereits viele Jahre Erfahrung mit einer sehr großen Anzahl von routinemäßig durchgeführten Bodenextraktionen;
- das Verfahren wird an vielen Orten auf der ganzen Welt eingesetzt.

Nach der Probenahme werden die Nematoden mit Hilfe des Oostenbrink-Elutriators¹ (Modell III) aus dem Boden extrahiert (siehe Bild A.3 und Anhang B). Bei diesem Verfahren trennt ein aufwärts gerichteter Wasserstrom die Nematoden von Bodenpartikeln und hält sie in der Suspension, während die schwereren Partikel absinken [10] [32] [43] [48]. Diese Suspension aus Nematoden und kleinen Partikeln geht durch drei Siebe hindurch (Maschenweite: 45 µm). Der Rückstand wird von den Sieben auf ein Wattefilter (Milchfilter) gespült. Das Wattefilter wird auf einem unterstützenden Sieb befestigt und in eine Schale mit 100 ml Leitungswasser gegeben. In drei Tagen trennen sich die Nematoden durch ihre aktive Abwärtsbewegung von den Partikeln auf dem Filter. So kriechen die lebenden Nematoden durch das Filter in die Schale mit dem Leitungswasser.

Nach der Extraktion werden die Nematoden in 2 × 10 % der 100-ml-Suspension ausgezählt, dann eingeeengt, konserviert und auf Massen-Objekträgern fixiert. Abschließend werden mindestens 150 Individuen oder ein fester Prozentsatz der Gesamtzahl in der Probe unter dem Mikroskop bestimmt.

Ausgewachsene Nematoden können bis zur Artebene bestimmt werden. Populationen im Boden bestehen jedoch häufig überwiegend aus Jungtieren und die taxonomische Gattungsebene stellt eine praktische (wenn auch weniger empfindliche) Art der Unterscheidung dar.

Alternative Extraktionsverfahren wie der Seinhorst-Elutriator [43] der Baermann-Trichter (Anhang C) können unter bestimmten Umständen geeignet sein, werden jedoch nicht als allgemeine Verfahren empfohlen, da der Oostenbrink-Elutriator robust, einfach zu bedienen und im Allgemeinen den meisten anderen Verfahren in quantitativer Hinsicht überlegen ist. Als Alternative wird für konservierte Proben, die nicht lebende Organismen enthalten, eine Flotations-Extraktion mit kolloidalem Siliziumdioxid empfohlen [25].

ANMERKUNG 2 Dieser Teil von ISO 23611 ist nicht auf aquatische Nematoden anwendbar, da diese nicht durch das Filter hindurchgehen. Für Sedimentproben sind spezielle Zentrifugierungsverfahren verfügbar.

ANMERKUNG 3 Die Bestimmung mit einem Lichtmikroskop beruht auf morphologischen Merkmalen. In einigen Fällen, z. B. bei Jungtieren, ist es nicht möglich, die Versuchsobjekte auf Artebene oder auch Gattungsebene zu unterscheiden.

Neue Verfahren wie DNA-Barcoding oder Metabarcoding [39] [53] bieten eine morphologieunabhängige Taxonomie, so dass auch Jungtiere bis zur Artebene oder Gattungsebene bestimmt werden können.

ANMERKUNG 4 Die Beprobung von Nematoden ist häufig Teil von umfassenderen Überwachungsprogrammen, die versuchen, die gesamte Bodenfauna oder Teile davon (z. B. die Mesofauna) zu erfassen. Beispiele für die Verwendung von wirbellosen Bodenlebewesen finden sich in Anhang D. Die Gestaltung solcher Programme ist nicht Gegenstand dieses Dokuments.

5 Reagenzien

5.1 Formalin [Formaldehyd-Lösung, 6 % (Volumenanteil)].

5.2 Paraffin, mit einem Schmelzpunkt von annähernd 60 °C.

6 Werkstoffe und Prüfeinrichtung

Es sind die übliche Laborausrüstung und Folgendes zu verwenden.

6.1 Probenahme

6.1.1 Bodenprobenehmer vom Typ offenes, geschlossenes oder längsgeteiltes Rohr.

BEISPIEL Ein im Handel erhältlicher Probenehmer für Rasenflächen (Durchmesser: 23 mm) oder ein Bodestangenbohrer (Bild A.2 und Bild A.3).

6.1.2 Kunststoffeimer, (Sammeln der Bodenproben im Freiland).

6.1.3 Kunststoffbehälter, zum Mischen der Sammelprobe.

6.1.4 Sieb, mit einer Maschenweite von 8 mm.

6.1.5 Beschichtete Tüten, Kunststofftüten oder Glasgefäße (Transport und Lagerung).

6.1.6 Wasserfester Marker oder vorgedruckte Etiketten.

6.2 Extraktion

6.2.1 Becher, mit einem Volumen von 100 ml bis 250 ml.

6.2.2 Waage, mit einem Wägebereich von 1 kg bis 25 kg, zum Wägen der Gesamtprobemasse.

6.2.3 Oostenbrink-Elutriator¹ (siehe auch Anhang B).

6.2.4 Drei Siebe, mit einer Maschenweite von 45 µm und einem Durchmesser von 30 cm.

6.2.5 Ein Sieb, mit einer Maschenweite von 250 µm und einem Durchmesser von 10 cm.

6.2.6 Kunststoffschale, mit einem Fassungsvermögen von etwa 2 l.

6.2.7 Klemmring.

6.2.8 Extraktionssieb, mit einer Maschenweite von 1 000 µm und einem Durchmesser von 16 cm.

6.2.9 Milch- oder Wattefilter.

6.2.10 Flache Schalen (Petrischalen) oder **spezielle Extraktionsschalen**.

6.2.11 Glasgefäß, mit einem Fassungsvermögen von 100 ml, mit Schraubkappe.

6.3 Auszählen

6.3.1 Präpariermikroskop, 10- bis 50-fache Vergrößerung.

6.3.2 Kleine Auszählschale mit Gitternetz oder **Objektträger** aus Glas mit Gitternetz.

ANMERKUNG Auszählschalen in verschiedenen Größen und mit unterschiedlichen Gitternetzen sind bei Herstellern von Laborausrüstungen erhältlich. Sie können ebenso aus kleinen Plastikpetrischalen gemacht werden, indem mit einer Nadel ein Gitter auf dem Boden eingeritzt wird.

6.3.3 Einfaches Handauszählgerät.

6.3.4 Aquariumpumpe, zum Mischen der Nematodensuspensionen.

6.3.5 Pipette (Tropfpipette aus Glas), mit einstellbarem Volumen.

6.3.6 Mikroskopiernadel.

6.3.7 Flasche, mit einem Volumen von 100 ml.

6.4 Fixierung und Vorbereitung der Massen-Objektträger

6.4.1 Wasserstrahlpumpe, zum Einengen der Suspension.

6.4.2 Objektträger aus Glas, 50 mm × 76 mm.

6.4.3 Deckgläser, 45 mm × 45 mm.

6.4.4 Elektrische Heizplatte.

6.4.5 Metallstempel, 40 mm × 40 mm, zum Aufbringen eines Paraffinsiegels auf die Objektträger aus Glas.

6.5 Bestimmung

6.5.1 Mikroskop, 400- bis 1 000-fache Vergrößerung.

6.5.2 Anzeigegerät mit Mikrometerokular.

6.5.3 Bestimmungsschlüssel [15].

6.5.4 Standardformular, zum Aufführen der Ergebnisse der Bestimmung.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Für die Qualitätssicherung muss jede Probe vom Moment ihrer Entnahme im Freiland an mit einem einmaligen Code versehen werden. Diesen Code (Etikett) muss die Probe über die gesamte Verarbeitung und Analyse behalten. Zum Zweck der Rückverfolgbarkeit der Proben und Erfassung der Analysenergebnisse sollten genormte (elektronische) Formulare verwendet werden. Diese grundlegenden Daten dürfen für weitere Berechnungen und die statistische Prüfung in einer Tabellenkalkulations- oder Datenbankdatei kombiniert werden.

7.2 Probenahme

Da die Dichte und die Vielfalt der Boden bewohnenden Nematoden in den obersten 10 cm des mineralischen Bodens am höchsten sind, ist für die meisten Fälle von biologischer Überwachung (Biomonitoring) ein Probenehmer für Rasenflächen (6.1.1) mit einem 10 cm oder 15 cm langen Probenahmerohr geeignet. Es wird empfohlen, ein geschlossenes Rohr mit feststehender Länge und feststehendem Durchmesser zu verwenden.

BEISPIEL 1 Ein Probenehmer für Rasenflächen besteht aus einem Stechbohrer aus Edelstahl (erhältlich in unterschiedlichen Größen), zu dem ein Bohrrohr aus Stahl, ein Sammeleimer (6.1.2) und ein Stab mit einem Stahlgriff gehören. Durch die konische Form des Rohres wird die Probe einfach in Richtung des Sammeleimers gedrückt, sobald die jeweils nächste Probe genommen wird. Die Probenahmetiefe ist konstant, und die Bodenkerne können leicht über eine große Fläche verteilt genommen werden (siehe Bild A.1). Dieses Gerät kann in vielen Situationen angewendet werden.

BEISPIEL 2 Alternativ kann als einfaches, billiges und schnell arbeitendes Gerät ein Bodenstangenbohrer angewendet werden. Stangenbohrer sind mit verschiedenen Durchmessern erhältlich. Mit Stangenbohrern entnommene Bodenproben sind weniger stark verdichtet. Der Nachteil besteht darin, dass das Bodenmaterial leichter verloren gehen kann (siehe Bild A.2).

BEISPIEL 3 Ist eine genaue Trennung der Bodenschichten erforderlich, kann ein Probenehmer mit längsgeteiltem Rohr angewendet werden. Dieser Probenehmer erfordert eine längere Handhabungszeit und ist weniger gut für große Probenzahlen und große Flächen geeignet (siehe Bild A.2).

Proben aus tieferen Schichten können mit einem Stangenbohrer entnommen werden, um eine übermäßige Bodenverdichtung zu vermeiden, sie können auch mit speziellen Probenehmern mit längsgeteiltem Rohr entnommen werden (siehe Bild A.2). Organisches oder Streumaterial kann in die Proben mit aufgenommen werden, es erhöht jedoch die Anzahl der vorgefundenen Nematoden teilweise erheblich. Die organischen Schichten dürfen separat beprobt werden. In diesem Fall wird ein Kernbohrer mit breiterem längsgeteiltem Rohr (5 cm bis 10 cm) bevorzugt, um die organischen Horizonte vom mineralischen Material zu trennen. Kleine Mengen an Streu können zur Extraktion der Nematoden ebenfalls in einem Oostenbrink-Elutriator¹ (6.2.3) behandelt werden. Die Wirksamkeit der Extraktion kann durch Einweichen und Mischen der organischen Anteile erhöht werden [40] [42].

Für eine repräsentative Probe eines bestimmten Typs von Ökosystemen ist eine typische Fläche von mindestens 0,5 ha, vorzugsweise jedoch von 1 ha erforderlich. Es wird empfohlen, eine Fläche auszuwählen, die in Bezug auf die Bodeneigenschaften, die Vegetation und die Bodennutzung (mehr oder weniger) homogen ist. Die untersuchte Fläche wird als Teil der Informationen zum Standort angegeben. Als Faustregel gilt, dass 100 Bodenkerne von 1 ha miteinander zu kombinieren sind. Bei kleineren Flächen (z. B. 100 m²) sind etwa 25 Kerne ausreichend, um einen Eindruck von der durchschnittlichen Zusammensetzung der Nematodenfauna zu erhalten und ausreichend Bodenmaterial zusammenzutragen. Eine höhere Probenahmedichte führt zu einer größeren Genauigkeit bei der Abschätzung der Individuendichte der Nematoden und der Zusammensetzung in Bezug auf die Arten. Jedoch muss ein Kompromiss hinsichtlich der Größe der schließlich analysierten Teilprobe der homogenisierten Sammelprobe des Bodens eingegangen werden. So führt eine sehr große Sammelprobe nicht zu mehr Informationen, da nur ein kleiner Teil dieser Probe analysiert wird und eine vollkommene Homogenisierung nicht möglich ist. Als Höchstanzahl für eine zusammengesetzte Sammelprobe werden 300 mit einem Probenehmer für Rasenflächen (23 mm Durchmesser) genommene Proben empfohlen. Für ein Biomonitoring-Programm sollte die Probendichte je Flächeneinheit vorzugsweise an allen Standorten gleich sein. Die Masse der Sammelprobe und die Anzahl der Bodenkerne darin müssen bekannt sein.

Der Probenahmeplan kann eine regelmäßige (gitterförmige) Probenahme, eine Probenahme nach einem bestimmten Muster oder eine Zufallsprobenahme festlegen. Bei größeren Standorten ist es am praktischsten, ein Zickzackmuster zu laufen und willkürlich Proben entlang diesem Weg zu nehmen. In dem Fall, dass ein Standort aus unterschiedlichen Parzellen besteht, ist die Anzahl der Bodenproben auf der Grundlage der Parzellengröße über diese zu verteilen. Proben von sehr untypischen Stellen des Standortes, wie Gräben, Feldwege oder Pfade, sind zu vermeiden.

Die zusammengetragene Sammelprobe wird in einem Kunststoffbehälter (6.1.3) homogenisiert. Dies kann, in Abhängigkeit davon, was in Hinblick auf Arbeit und Transport am praktischsten ist, auf dem Feld oder im Labor erfolgen. Der Mischvorgang beginnt mit einem Zerkrümeln der Kerne durch ein Sieb mit einer Öffnungsweite von 8 mm (6.1.4). Anschließend wird der Boden vorsichtig gemischt, bis die Masse in Farbe und Beschaffenheit einheitlich ist. Das Mischen und Vorbereiten der Probe kann bei Sammelproben aus Tonböden oder mit vielen Wurzeln durchzogenem Mutterboden mehr als eine Stunde beanspruchen. Jedoch ist dieser Schritt für alle Analysen, die auf ihm aufbauen, von größter Wichtigkeit und sollte ausreichend beachtet werden. Grobes organisches Material, Wurzeln und Steine sind zu entfernen. Die abschließende Auswahl in Bezug auf Einzelheiten der Arbeit ist im Freiland-Probenahmeprotokoll festzulegen und muss wiederum für das gesamte Biomonitoring-Programm einheitlich sein.

Ist die Sammelprobe homogenisiert, wird etwa ein Liter für weitere Untersuchungen daraus entnommen. Dies kann durch Entnahme mehrerer Löffel voll von verschiedenen Teilen der Sammelprobe erfolgen, um eine repräsentative Teilprobe zu erhalten. Die Probe ist in eine etikettierte Kunststofftüte oder ein etikettiertes Glasgefäß zu geben (6.1.5). An diesem Punkt können zum Zwecke weiterer biotischer und abiotischer Analysen weitere Teilproben aus der Sammelprobe entnommen werden. Bodenproben für die Nematodenanalyse sind vor der Extraktion bei 4 °C zu lagern. Die Lagerdauer sollte so kurz wie möglich gehalten werden und vier Wochen nicht überschreiten. Diese Temperatur ist möglicherweise nicht für alle Nematoden optimal (z. B. Aphelenchoididae, Anguinidae; siehe Literaturhinweis [13]). In jedem Fall ist die geeignete Temperatur vor der Probenahme festzustellen, sofern diese außerhalb der holarktischen Region (z. B. in den Tropen) erfolgt.

7.3 Extraktion

Die Boden-(teil-)probe aus dem Freiland wird vor der Extraktion erneut gemischt, und ein Becher (6.2.1) wird mit 100 ml bis 250 ml Boden gefüllt. Die Probe ist zu wägen, um die Ergebnisse auf Frischmasse beziehen zu können. In einem weiteren Teil derselben Bodenprobe wird die Bodenfeuchte gemessen, um die Enddichte in Einheiten der Trockenmasse des Bodens angeben zu können. Sofern nicht im Freiland extra Material aus derselben Sammelprobe entnommen wurde, ist der übrige Anteil der Probe für die abiotische Analyse zu lagern.

Der Oostenbrink-Elutriator (6.2.3) ist vorzubereiten. Die Probe ist auf das oberste Sieb zu geben, und der Boden ist in den Elutriator zu spülen. Die jeweilige Geschwindigkeit des Wasserstroms ist vom Typ des angewendeten Trichters abhängig. Eine ausführliche Beschreibung des Apparates und seiner Anwendung ist in den Literaturhinweisen [10] und [48] angegeben. Die jüngste Version des Oostenbrink-Trichters hat größere Maße und wird vollautomatisch betrieben (siehe Bild A.5). Sie ist für die routinemäßige Extraktion großer Probenzahlen geeignet. Die Bodenprobe wird durch das oberste Sieb in den Trichter gewaschen. Sobald der Trichter durch den aufwärts gerichteten Wasserstrom gefüllt ist, werden die Nematoden von den schwereren Bodenpartikeln getrennt.

ANMERKUNG 1 Sollte aus irgendeinem Grund kein Oostenbrink-Elutriator verfügbar sein, kann der Baermann-Trichter/die Baermann-Schale als Alternative eingesetzt werden. Einzelheiten zur Anwendung sind in Anhang C angegeben.

Der Stopfen am Trichter ist zu entfernen, sobald das Wasser den Rand erreicht hat, und der Wasserstrom ist durch drei übereinander angeordnete Siebe mit einer Maschenweite von 45 µm (6.2.4) zu leiten, um den Rückstand aufzufangen. Über den drei Sieben (6.2.4) kann ein zusätzliches oberstes Sieb (6.2.5) angebracht werden, um große Nematoden aufzufangen, die nicht durch das abschließende Wattefilter hindurchgehen. Dieses Sieb (6.2.5) ist direkt in eine Extraktionsschale (flache, mit Wasser gefüllte Schale) (6.2.10) zu geben und für drei Tage in einem Schrank zu lagern. Bei höheren Umgebungstemperaturen sollte der Schrank befeuchtet und von Wärmequellen entfernt gehalten werden. Die Siebe (6.2.4) werden unter einem leichten Wasserstrom gespült, der in einer Kunststoffschale (6.2.6) aufgefangen wird. Die Suspension mit den Nematoden kann für 15 min bis 30 min beiseite gestellt werden; in dieser Zeit sinken die Nematoden auf den Boden ab. Dies hat den Vorteil, dass überstehendes Wasser in der Kunststoffschale schneller ausgeschüttet werden kann. Der Inhalt der Schale ist über ein Doppelfilter [z. B. Wattefilter (Milchfilter)] (6.2.9) zu gießen, das mit einem Klemmring (6.2.7) an einem Extraktionssieb (6.2.8) befestigt ist. Das Extraktionssieb (6.2.8) ist mit dem Rückstand in eine Extraktionsschale (6.2.10) zu geben. Die aktiven Nematoden im Rückstand

kriechen über die Dauer von drei Tagen durch das Filter (6.2.9) in die Extraktionsschale (6.2.10) mit den 100 ml Leitungswasser. Es ist wichtig, dass das Filter (6.2.9) mit dem Wasser in der Extraktionsschale (6.2.10) im Kontakt bleibt. Erforderlichenfalls wird während dieser Dauer von drei Tagen Leitungswasser nachgefüllt. Nach drei Tagen werden sowohl das Sieb mit der Maschenweite von 250 µm (6.2.5) als auch das Sieb mit den Wattefiltern (6.2.9) entnommen, und der Inhalt der Extraktionsschalen (6.2.10) kann in ein Glasgefäß mit einem Volumen von 100 ml (6.2.11) gegossen werden. Die Gefäße sind mit den richtigen Probencodes zu etikettieren. Anschließend können die Nematoden ausgezählt werden.

ANMERKUNG 2 Andere Filtermaterialien als Wattefilter sind annehmbar, sofern nachgewiesen wurde, dass deren Eigenschaften in Bezug auf die Nematodenextraktion denen des Wattefilters entsprechen (d. h. keine Änderung der Maschenweite nach der Absorption von Wasser).

ANMERKUNG 3 Mit diesem Verfahren können nur mobile Formen extrahiert werden. Daher werden bei der Auszählung die sich nicht bewegendenden Formen (Eier, tote Organismen im Boden) nicht berücksichtigt. Diese Art der Extraktion führt nicht zu dem genauen Wert der Anzahl der Nematoden (in jedem Entwicklungsstadium) zum Zeitpunkt der Extraktion. Für konservierte Proben, die nicht lebende Organismen enthalten, ist diese Methode nicht geeignet. Hier werden Flotations-/Zentrifugationsverfahren unter Verwendung von kolloidalem Siliziumdioxid empfohlen, da sie die Extraktion aller Formen von Nematoden ermöglichen [25].

ANMERKUNG 4 Für die letzte Extraktionsphase werden drei Tage empfohlen. In dieser Stufe werden die Wattefilter (in einem unterstützenden Sieb) in eine flache Schale mit 100 ml Leitungswasser gegeben. Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass 59 % der Nematoden in den ersten 24 h herauskriechen, 73 % nach zwei Tagen, und 82 % werden nach drei Tagen aufgefangen [52]. Diese Zahlen basieren auf einem Vergleich mit den nach sieben Tagen aufgefundenen Nematoden. Aus praktischen Gründen wird eine Standardextraktionsdauer von drei Tagen gewählt. Eine längere Extraktionszeit hat den Nachteil, dass das Wasser in den Schalen verdunstet, Nematoden sterben oder aus den Eiern zwischen den Partikeln schlüpfen können.

7.4 Auszählen

Vor dem Auszählen werden die Inhalte der beiden Gefäße (6.2.11), die die Nematoden einer Bodenprobe enthalten, zusammengebracht. Es ist mindestens 2 h zu warten, um sicher sein zu können, dass die Nematoden auf den Boden abgesunken sind. Die Suspensionen werden eingengt (dekantieren oder absaugen), sodass sie in eine 100-ml-Flasche (6.3.7 oder 6.2.11) passen. Sofern erforderlich, ist zusätzliches Leitungswasser in das Gefäß zu geben, bis es genau 100 ml enthält. Die Suspension ist gründlich (3 min bis 5 min) mit Luft (6.3.4) zu durchmischen. Unmittelbar danach sind 10 ml der gemischten Suspension mit einer Pipette (6.3.5) zu entnehmen und in eine Auszählschale (6.3.2) zu geben. Dies ist zweimal durchzuführen. Die Anzahl (6.3.3) der Nematoden ist unter einem Stereomikroskop (6.3.1) auszuzählen, während die Auszählschale langsam gedreht wird. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Auszählungen muss innerhalb von 10 % liegen. Anderenfalls war die Suspension wahrscheinlich nicht ausreichend homogen, und der Auszählvorgang ist zu wiederholen. Die Anzahl der Nematoden in jeder Auszählschale ist auf einem Standardformular zu verzeichnen. Die durchschnittliche Anzahl der Doppelauszählung, hochgerechnet auf 100 ml Suspension, stellt den Schätzwert für die Individuendichte der Nematoden in der extrahierten Menge (Volumen bzw. Masse) des Bodens dar. Die ausgezählte Teilprobe ist wieder in die 100-ml-Flasche (6.3.7) zu geben. Als nächster Schritt sind die Nematoden durch Hitze abzutöten und mit Formalin (5.1) zu fixieren.

Das Volumen der Suspension in den Gefäßen und das mit der Pipette zum Auszählen entnommene Volumen der gemischten Suspension sind von der Dichte der Nematoden in den Gefäßen abhängig. Obwohl ein Suspensionsvolumen von 100 ml und die zum Auszählen entnommene Menge (10 ml) in den meisten Fällen gut geeignet sind, können diese Mengen doch geändert werden. Wenn die Nematodendichte sehr gering ist, sollten so gut wie alle Nematoden in der Bodenprobe mitgezählt werden, während bei einer sehr hohen ursprünglichen Dichte im Boden schon 1 % der Suspension zu viele einzelne Nematoden enthalten kann.

WARNUNG — Für den Umgang mit Formalin sollten entsprechende Vorkehrungen getroffen werden (z. B. das Tragen von Handschuhen und die Handhabung der Proben in einem Abzugsschrank), um die durch Einatmen oder Hautkontakt bedingten Gefahren zu vermeiden. Nach dem von den Herstellerfirmen für 37%ige Formaldehyd-Lösung herausgegebenen Datenblatt zur Materialsicherheit ist diese Verbindung hautreizend und wird als krebserregend betrachtet (Menschen: begrenzt nachgewiesen; Tiere: hinreichend nachgewiesen). Sie ist in den Industrieländern gemeldet und für den wissenschaftlichen Gebrauch zugelassen.

7.5 Fixierung und Herstellung der Massen-Objektträger

Wurden die Nematoden erst vor kurzem ausgezählt, lässt man sie für mehrere Stunden auf den Boden des Gefäßes absinken. Während dieser Zeit kann die Suspension bei 4 °C in einem Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Suspension ist einzuengen, bis noch etwa 5 mm Wasser im Gefäß verblieben sind. Dies kann mit Hilfe einer kleinen Pipette (6.3.5) erfolgen, die an eine (Wasserstrahl-)Vakuumpumpe (6.4.1) angeschlossen ist. Ein über die Öffnung der Pipette gespanntes Stück Planktongaze (mit einer Porengröße von 10 µm) verhindert den Verlust von Nematoden. Es werden etwa 10 ml kochendes Wasser zu der eingeeengten Probe hinzugegeben, um die Nematoden zu töten und zu dehnen. Anschließend sind etwa 30 ml Formalin (5.1) hinzuzugeben, um die Probe zu konservieren. Die Probe kann nun für eine längere Zeit aufbewahrt werden (d. h. mehrere Monate), und es können Massen-Objektträger für die Bestimmung der Arten vorbereitet werden.

Vor der Herstellung der Massen-Objektträger ist die Probe erneut einzuengen. Die Objektträger (6.4.2) sind durch Hinzufügen eines kleinen Paraffinwürfels (Wulst) (5.2) mit einem erwärmten Stempel (6.4.5) vorzubereiten. Der Stempel ist kurz auf das Paraffin zu pressen, sodass dieses schmelzen kann und am Stempel haften bleibt. Dann ist der Stempel auf den Objektträger aus Glas zu pressen. Für jede Probe sind zwei Objektträger herzustellen. Zwei Tropfen der (geschüttelten) Suspension sind auf jeden Objektträger zu geben. Ein Deckglas (6.4.3) ist über den Paraffinwürfel von etwa 40 mm mal 40 mm und die in den Tropfen Fixierungsmittel befindlichen Nematoden zu geben. Der Objektträger ist auf einer Heizplatte (6.4.4) auf 65 °C zu erhitzen, sodass das Paraffin erneut schmilzt. Die Objektträger sind direkt zu entnehmen, da anderenfalls die Nematoden beschädigt werden können. Das Paraffin verfestigt sich, und die Nematoden sind auf den Objektträgern eingebettet. Die Objektträger sind mit der Nummer der Probe sowie mit A oder B zu kennzeichnen. Die Objektträger können mehrere Monate lang aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Die Auswahl des Fixierungsverfahrens ist vom Untersuchungsziel abhängig. Für eine taxonomische Beschreibung werden Holotypen hergestellt, indem die Tiere dehydriert und anschließend in wasserfreies Glycerin überführt werden [44]. Zu Monitoringzwecken sind die Wärmefixierung und das zeitweise Einbetten (einige Wochen bis mehrere Monate), wie oben beschrieben, ausreichend und praktisch in der Durchführung.

7.6 Bestimmung

Die Objektträger mit der Kennzeichnung A bzw. B (siehe 7.5) der jeweils selben Probe werden, wenn möglich, jeweils durch verschiedene Personen analysiert. Zur Bestimmung ist ein Lichtmikroskop (6.5.1) anzuwenden. Spezielle optische Verfahren, wie Interferenzkontrast (6.5.2), können geeignet sein, um Strukturen sichtbar zu machen. Mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels für Nematoden (6.5.3) werden auf jedem Objektträger 75 Exemplare bestimmt. Alternativ kann ein konstanter Anteil (%) der Gesamtanzahl in der Probe bestimmt werden, um ein konstantes Niveau an Bestimmungsauflösung beizubehalten.

Die taxonomische Bezeichnung (Bezeichnung von Familie, Gattung oder Art) jedes Versuchsobjektes ist niederzuschreiben, und das Versuchsobjekt ist jeweils als männlich, weiblich oder Jungtier zu charakterisieren. Die Bestimmungsschlüssel nach [15] decken die meisten in Europa frei lebenden Arten ab. Weitere Standardwerke sind die in den Literaturhinweisen [11] und [45] aufgeführten Bücher. Für einige Gruppen sind zum Zwecke der Bestimmung der Art spezifische Veröffentlichungen anzuwenden. Jungtiere mit noch unvollständig ausgebildeten Geschlechtsorganen und weiteren morphologischen Strukturen können in den meisten Fällen nur bis zur Gattungsebene bestimmt werden. Ruhestadien (Dauerlarven) werden als extra Gruppe ausgezählt.

Die Ergebnisse der Bestimmungen und die Verhältnisse zwischen den Taxa werden genutzt, um die Anzahl je Art in der ursprünglichen Bodenprobe abzuschätzen. Die Berechnungen können in einem Tabellenkalkulations-Computerprogramm vorgenommen werden.

8 Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Nematodenauszählungen und -bestimmungen werden in einer elektronischen Datenbank (Tabellenkalkulations- oder Datenbankprogramm) gespeichert. Die Grunddaten der Analysen werden in Einheiten der Frischmasse, der Trockenmasse und der Oberfläche (dm^2 oder m^2) des Bodens umgewandelt. Die Werte „je Flächeneinheit“ können aus dem Durchmesser des Bodenkernes, der Anzahl der Kerne in der Sammelprobe, der Gesamtmasse der Sammelprobe und der Masse der extrahierten Bodenmenge berechnet werden. Die Taxonzusammensetzung wird nach Ernährungsgruppen nach Literaturhinweis [57] zugeordnet. Für die ökologische Charakterisierung (siehe Literaturhinweis [17]) wird die Kolonialisierer-Dauersiedler-Skala (colonizer-persister (cp) scale) angewendet. Anschließend können der Maturity-Index [16] [17] und die Anteile der Ernährungsgruppen zusätzlich zu genormten Diversitätsindizes berechnet werden.

Die folgenden Messendpunkte können für die Bioklassifizierung eines Bodens sowie für die Bewertung der Auswirkungen des chemischen oder anthropogenen Stresses angewendet werden:

- Gesamtindividuumdichte;
- Anzahl der Arten;
- Anzahl der Arten nach Ernährungsgruppen und c-p-Klassen;
- Verhältnis zwischen bakterien- und pilzfressenden Gruppen (NCR-Verhältnis):

$$NCR = \frac{B}{(B + F)}$$

Dabei ist

NCR Nematode Channel Ratio;
B der Anteil der Bakterienfresser;
F der Anteil der Pilzfresser;

- Maturity-Index.

Die Gesamtanzahl der Nematoden und die taxonomische Vielfalt geben einen ersten (groben) Hinweis auf die ökologischen Bedingungen eines Bodentyps. Eine Anreicherung (Eutrophierung) kann durch hohe Zahlen festgestellt werden, wobei häufig einige opportunistische Arten vorherrschen. Verschmutzung und sehr raue abiotische Bedingungen führen zu einer geringen Individuumdichte der Nematoden, können jedoch mit einer vielfältigen Fauna zusammenfallen.

Der Maturity-Index sowie der Anteil der c-p-Klassen und der Ernährungsgruppen geben einen guten Einblick in Vorgänge und Störungen im Boden-Ökosystem. Durch Bakterien und Pilze dominierte Abbaupfade im Boden können ebenso wie reife Boden-Ökosysteme und übermäßige Düngung oder Nährstofferschöpfung festgestellt werden. Diese integrierenden Indikatoren sind aufgrund des höheren repräsentierten Organisationsgrades stabiler und robuster.

Das Wissen über Boden bewohnende Nematoden hat sich bis zu einem Grad entwickelt, dass zur Beschreibung der Reaktion auf das Habitat Modelle für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens im Verhältnis zu den abiotischen Faktoren aufgestellt werden können [30]. In naher Zukunft kann dies zu Prognosezwecken eingesetzt werden. Diese ökologischen Anwendungen beruhen jedoch auf systematischen

und zuverlässigen Monitoringdaten. Freilandbeobachtungen schließen einen gewissen Grad an natürlicher Variation ein. Der Grad der Variationen in einem Ökosystemtyp ist von zeitlichen und geographischen Faktoren sowie dem Einfluss durch Menschen abhängig. Für die biologische Charakterisierung muss die Varianz der ökologischen Merkmale bekannt sein. Daher sollten ausreichend (10 bis 20) Wiederholungen eines bestimmten Habitattyps in einem Monitoringsystem vorliegen, erforderlichenfalls einschließlich geographischer/geologischer Kategorien oder Differenzierungen. Die Definition ökologischer Indikatorwerte in ursprünglichen oder ungestörten Situationen schafft die Möglichkeit einer Beurteilung der ökologischen Bodenbeschaffenheit.

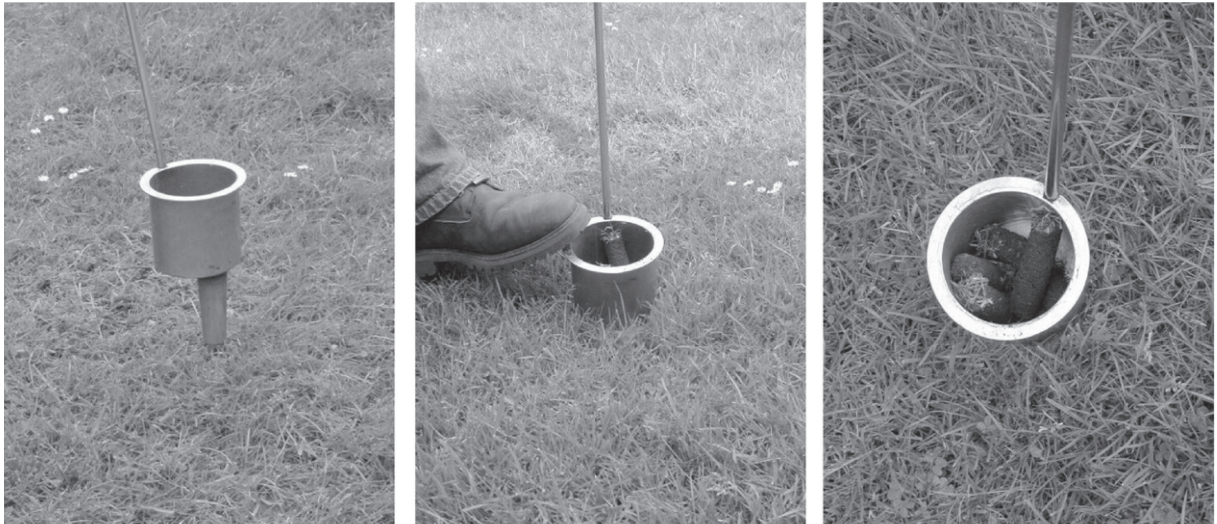
9 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse sowie die während der Studie verwendeten Methoden und Variablen enthalten. Er muss folgende Angaben enthalten:

- a) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 23611-4;
- b) vollständige Beschreibung des Aufbaus und der Durchführung des Versuchs (Extraktionsverfahren, z. B. Oostenbrink-Elutriator);
- c) Beschreibung und Charakterisierung des Untersuchungsstandortes (insbesondere die Bodeneigenschaften);
- d) Probenahmeverfahren mit der Spezifikation des Bohrertyps, der Anzahl der Proben und der Fläche, von der die Proben entnommen wurden;
- e) Beschreibung der Probenahmebedingungen, einschließlich des Datums und der Dauer der Probenahme auf dem Feld sowie der Klimaparameter, z. B. Lufttemperatur;
- f) Einzelheiten zur Fixierung und Konservierung des biologischen Materials;
- g) die auf die verschiedenen Einheiten umgerechneten Werte (Frischmasse, Trockenmasse und Fläche);
- h) Diskussion der Ergebnisse;
- i) Tabellenkalkulations- oder Datenbankdatei mit Rohdaten und Berechnungen;
- j) alle Informationen, einschließlich der gemessenen Rohdaten, die sich während aller Phasen der Untersuchung erschlossen haben können, und alle Probleme, die aufgetreten sein können.

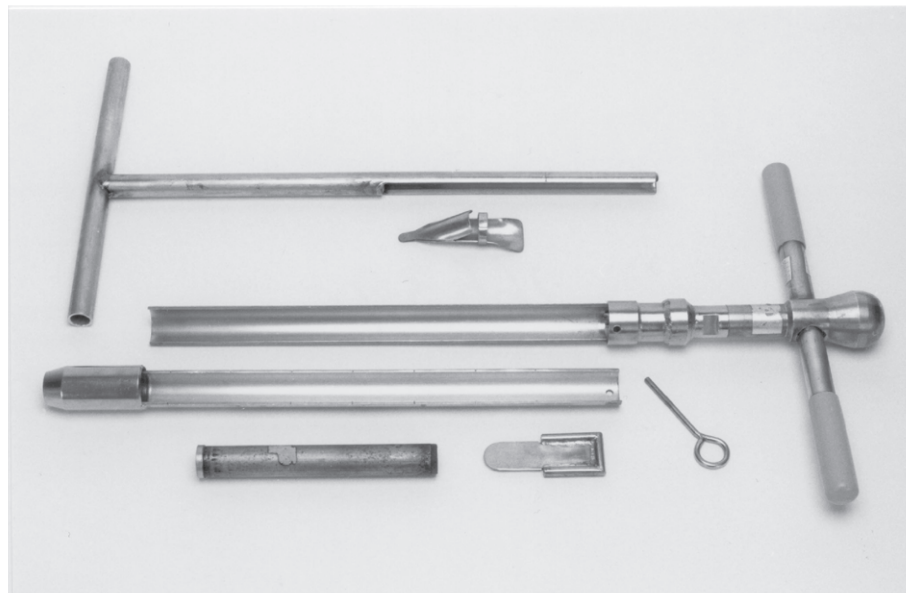
Anhang A (informativ)

Bilder zur Ausrüstung und zu den Verfahren bei der nematologischen Forschung



ANMERKUNG Photographiert von A. J. Schouten, RIVM, NL.

Bild A.1 — Probenehmer für Rasenflächen während der Anwendung



ANMERKUNG In der Bodenwissenschaft und bei den Probenahmen landwirtschaftlicher Böden werden im Allgemeinen noch Stangenbohrer angewendet.

Bild A.2 — Bodenstangenbohrer (oben) und Bohrer mit längsgeteiltem Rohr