

DIN ISO 11268-2

ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2010-11-05
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO 11268-2:2000-03

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer
(*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) –
Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung
(ISO/CD 11268-2:2010)**

Soil quality –

Effects of pollutants on earthworms

(*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) –

Part 2: Determination of effects on reproduction (ISO/CD 11268-2:2010)

Qualité du sol –

Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre

(*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) –

Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction (ISO/CD 11268-2:2010)

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2010-07-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an naw@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevante Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien und Material.....	10
6 Geräte.....	12
7 Durchführung	12
7.1 Prüfaufbau	12
7.1.1 Allgemeines	12
7.1.2 Vorversuch	12
7.1.3 Hauptprüfung	13
7.2 Herstellung der Prüfmischung	13
7.2.1 Prüfung des verunreinigten Bodens.....	13
7.2.2 Prüfung von dem Prüfsubstrat zugegeben Substanzen.....	14
7.2.3 Vorbereitung der Kontrollgefäße	15
7.3 Zugabe des biologischen Materials	15
7.4 Prüfbedingungen und Messungen.....	15
7.5 Referenzsubstanz	15
8 Berechnung und Auswertung	16
8.1 Berechnung	16
8.2 Angabe der Ergebnisse.....	16
9 Gültigkeit der Ergebnisse	16
10 Statistische Analyse	16
10.1 Allgemeines	16
10.2 Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs	16
10.3 Hauptprüfung	17
11 Prüfbericht.....	18
Anhang A (informativ) Bestimmung der chronischen Toxizität von Chemikalien auf Regenwürmer unter tropischen Bedingungen	19
A.1 Allgemeines	19
A.2 Änderungen der Abschnitte 3, 5, 6 und des Anhangs B	19
A.2.1 In Bezug auf Abschnitt 3	19
A.2.2 In Bezug auf Abschnitt 5	19
A.2.3 In Bezug auf Abschnitt 6	20
A.2.4 In Bezug auf Anhang B	20
Anhang B (informativ) Anzucht von <i>Eisenia fetida</i> und <i>Eisenia andrei</i>	21
Anhang C (informativ) Auszähltechniken für die aus den Kokons geschlüpften juvenilen Würmer	22
Anhang D (informativ) Bestimmung der Wasserhaltekapazität	23
D.1 Geräte.....	23
D.2 Durchführung	23
D.3 Berechnung der Wasserhaltekapazität (<i>WHC</i>)	23

Anhang E (informativ) Leistungsfähigkeit des Verfahrens.....	24
E.1 Allgemeines	24
E.2 Kriterien für die Gültigkeit des Verfahrens	24
E.3 Empfindlichkeit des Prüfsystems	24
E.4 Ergebnisse von Prüfungen mit Borsäure als Referenzsubstanz	25
Literaturhinweise	27

Nationales Vorwort

Dieser Norm-Entwurf wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ aufgestellt. Für Deutschland war der NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ an der Bearbeitung beteiligt.

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

DIN ISO 11268 besteht aus den folgenden Teilen, die unter dem Haupttitel *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida/Eisenia andrei)* veröffentlicht wurden:

— Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität

— Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung

— Teil 3: Anleitung für die Bestimmung von Wirkungen unter Freilandbedingungen

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10381-6	siehe	DIN ISO 10381-6
ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN ISO 11260
ISO/CD 11268-1	siehe	E DIN ISO 11268-1
ISO 11277	siehe	DIN ISO 11277
ISO 11461	siehe	DIN ISO 11461
ISO 11465	siehe	DIN ISO 11465

Änderungen

Gegenüber DIN ISO 11268-2:2000-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) als Prüforganismus *Eisenia andrei* aufgenommen;
- b) Borsäure als alternative Referenzsubstanz aufgenommen;
- c) Abschnitt 10 „Statische Analyse“ aufgenommen;
- d) Anhang A „Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien auf Regenwürmer unter tropischen Bedingungen“ aufgenommen;
- e) Anhänge D „...“ und E „ „ gestrichen;
- f) E.4 „Ergebnisse von Prüfungen mit der als Referenzsubstanz eingesetzten Borsäure“ ergänzt;
- g) die Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*

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

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

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

E DIN ISO 11268-1, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (Eisenia fetida/Eisenia andrei) — Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität*

DIN ISO 11277, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren mittels Siebung und Sedimentation*

DIN ISO 11461, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wassergehaltes des Bodens als Volumenanteil mittels Stechzylinder — Gravimetrisches Verfahren*

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

**Bodenbeschaffenheit —
Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer
(*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) —
Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung**

Einleitung

Ökotoxikologische Prüfsysteme werden angewendet, um Informationen über die Wirkungen von Kontaminanten im Boden zu erhalten, und sie sind zur Ergänzung der herkömmlichen chemischen Analysen (siehe ISO 15799) vorgesehen. ISO 15799 enthält eine Aufstellung und eine kurze Charakterisierung der empfohlenen und genormten Prüfsysteme. Aquatische Prüfsysteme mit Bodeneluat werden angewendet, um Informationen über den Anteil der Verunreinigungen zu erhalten, die möglicherweise über den Wasserweg (Rückhaltefunktion von Böden) das Grundwasser erreichen, wogegen terrestrische Prüfsysteme zur Bewertung der Lebensraumfunktion der Böden angewendet werden. Als genormte Prüfsysteme für die Lebensraumfunktion, die Regenwürmer als Indikatororganismen einsetzen, gibt es eine akute Prüfung für das Überleben und eine chronische Prüfung der Reproduktion.

Dieser Teil von ISO 11268 beschreibt ein Verfahren, das auf der Bestimmung der subletale Wirkungen der verunreinigten Böden gegenüber adulten Regenwürmern der Arten *Eisenia fetida* (Savigny 1826) und *Eisenia andrei* (André 1963) basiert. Optional kann das Verfahren zur Bewertung von Chemikalien, die den Standardböden (z. B. künstlicher Boden) zugefügt wurden, auf ihr subletales Gefährdungspotential gegenüber Regenwürmern angewendet werden. Schließlich werden Informationen gegeben, wie dieses Verfahren zur Prüfung von Chemikalien unter tropischen Bedingungen (siehe Anhang A) anzuwenden ist.

Eisenia fetida und *Eisenia andrei* sind als Vertreter der Bodenfauna und im Besonderen der Regenwürmer zu betrachten. Hintergrundinformationen zur Ökologie der Regenwürmer und ihren Einsatz bei ökotoxischen Bewertungen sind verfügbar. Andere Arten, z. B. *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus* und *Lumbricus terrestris* wurden auch als Prüforganismen verwendet. Diese und andere Arten haben nicht den Nachweis erbracht, allgemein empfindlicher zu sein, und die Datengrundlage und die Erfahrungswerte bei der Bodenbewertung sind ebenfalls gering.

Dieser Teil von ISO 11268 wurde unter Berücksichtigung der von der Organisation für wirtschaftliche Entwicklung und Zusammenarbeit und der Europäischen Union (siehe Verweisungen in den Literaturhinweisen) empfohlenen Prüfverfahren erstellt.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 11268 legt eines der Verfahren zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden und zur Bestimmung der Wirkungen der Bodenverunreinigungen und Chemikalien auf die Reproduktion von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* bei Aufnahme über die Haut und durch die Nahrung in einer chronischen Prüfung fest. Das Verfahren ist anwendbar auf Böden und Bodenmaterialien von nicht bekannter Qualität, z. B. von verunreinigten Standorten, veränderten Böden, Böden nach der Sanierung, landwirtschaftlichen oder anderen betroffenen Standorten und Abfallmaterialien.

Die Wirkungen der Substanzen werden mit einem Standardboden, vorzugsweise mit einem festgelegten künstlichen Bodensubstrat, bewertet. Bei verunreinigten Böden werden die Wirkungen im Prüfboden und in einem Kontrollboden bestimmt. Entsprechend der Zielsetzung der Studie sollten die Kontrolle und das verdünnte Substrat (Verdünnungsreihen des verunreinigten Bodens) entweder ein mit der zu prüfenden Bodenprobe vergleichbarer, nicht verunreinigter Boden (Referenzboden) oder ein Standardboden (z. B. künstlicher Boden) sein.

Es werden Informationen gegeben, wie dieses Verfahren zur Prüfung von Chemikalien unter tropischen Bedingungen anzuwenden ist.

Das Verfahren ist nicht auf flüchtige Substanzen anwendbar, d. h. Substanzen, bei denen H (Henry-Konstante) oder der Luft/Wasser-Verteilungskoeffizient größer als 1 ist, oder bei denen der Dampfdruck bei 25 °C 0,013 3 Pa überschreitet.

Dieses Verfahren berücksichtigt nicht den möglichen Abbau der Substanz während der Prüfung.

WARNUNG — Verunreinigte Böden können unbekannte Gemische von toxischen, mutagenen oder auf andere Art schädlichen Chemikalien oder infektiöse Mikroorganismen enthalten. Berufliche Gesundheitsrisiken können durch Staub oder verdunstete Chemikalien während der Handhabung und Inkubation auftreten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory*

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 11268-1, *Soil quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) — Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*

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

ISO 11461, *Soil quality — Determination of soil water content as a volume fraction using coring sleeves — Gravimetric method*

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

ISO 15176:2002, *Soil quality — Characterization of excavated soil and other soil materials intended for re-use*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Wachstum

Zunahme der Biomasse (d. h. der Frischmasse der Organismen)

ANMERKUNG Es wird in Prozent der Frischmasse der Organismen bei Versuchsbeginn angegeben.

3.2

Reproduktion

Reproduktionsleistung

Zunahme der durchschnittlichen Anzahl der Nachkommen je Prüfbehälter nach acht Wochen unter den festgelegten Prüfbedingungen

3.3

Reproduktionsrate

durchschnittliche Anzahl der aus den abgelegten Kokons geschlüpften und bis zum Ende der Prüfdauer überlebenden Nachkommen für jeden adulten, nach vier Wochen noch lebenden Regenwurm

3.4

EC_x

Wirkungskonzentration

Konzentration oder prozentuale Verdünnung des verunreinigten Bodens, bei der abgeschätzt wird, dass sie die Reproduktionsrate am Ende der Prüfung um x % im Vergleich zur Kontrolle innerhalb des Prüfzeitraums

ANMERKUNG X ist der Prozentwert (10, 20, 25, 50) dieser Wirkung.

3.5

LOEC

en: Lowest Observed Effect Concentration

kleinstes geprüftes Mischungsverhältnis eines Prüfbodens in einem Referenz- oder Standardkontrollboden, bei dem eine statistisch signifikante Wirkung beobachtet wird oder die niedrigste in der Prüfung verwendete Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung zeigt

ANMERKUNG Alle Prüfmischungen über der LOEC haben eine nachteilige Wirkung, die gleich oder größer ist, als die die bei der LOEC vorliegt.

3.6

NOEC

en: No Observed Effect Concentration

Bodenmischungsverhältnis, das gleich unterhalb der LOEC liegt, oder die höchste geprüfte Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante letale oder andere Wirkung zeigt, z. B. Masseänderung ($p < 0,05$)

3.7

Prüfmischung

Mischung der Prüfsubstanz mit dem Prüfsubstrat, Mischung von verunreinigtem Boden mit dem Prüfsubstrat oder Mischung von verunreinigtem Boden mit einem nicht verunreinigten Boden, vergleichbar mit der zu prüfenden Bodenprobe

3.8

Kontaminante

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

[ISO 15176:2002]

3.9

Referenzboden

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

3.10

Standardboden

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

BEISPIEL Eurosoils [16], künstlicher Boden [19].

3.11

Kontrollboden

Referenz- oder Standardboden, der als Kontrolle und als Medium für die Herstellung der Verdünnungsreihen mit den Prüfböden oder einer Referenzsubstanz verwendet wird und das Vorhandensein der Regenwürmer ermöglicht

ANMERKUNG 1 Die Eigenschaften des Standardbodens können von denen des Prüfbodens abweichen.

ANMERKUNG 2 Sowohl LC50 als auch NOEC werden in Milligramm der Prüfschubstanz je Kilogramm (Trockenmasse) des Prüfschubstrates (5.2) angegeben. Bodenmischungen werden in Prozent kontaminierter Boden, basierend auf der Bodentrockenmasse, angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Die Wirkungen auf die Reproduktionsleistung, das Wachstum und das Überleben von adulten Regenwürmern (Arten: *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei*), die einem Verdünnungsbereich des verunreinigten Bodens oder einem Konzentrationsbereich einer Prüfschubstanz ausgesetzt werden, wird bestimmt. Die Prüfmischungen werden zu Prüfbeginn hergestellt und innerhalb des Prüfzeitraumes nicht erneuert.

Nach vier Wochen werden die Wirkungen auf die Mortalität und die Biomasse bestimmt. Nach weiteren vier Wochen wird die Wirkung auf die Reproduktionsleistung durch Auszählen der Anzahl der aus den Kokons geschlüpften Nachkommen bestimmt. Die aus den Prüfungen erhaltenen Ergebnisse werden mit einer Kontrolle verglichen und für die Bestimmung der Verdünnungen oder Konzentrationen verwendet, die keine Wirkungen auf die Biomasse, Mortalität und Reproduktionsleistung (NOEC) hervorrufen und für die Konzentration (Verdünnung), die x % Reduzierung der aus den Kokons geschlüpften juvenilen Tiere verglichen mit der Kontrolle (EC_x, 56 d) ergibt.

Alle Prüfverdünnungen/-konzentrationen oberhalb der LOEC müssen eine schädigende Wirkung aufweisen, die gleich oder größer als die bei der LOEC beobachtete Wirkung ist. Besteht keine Vorkenntnis über die voraussichtlich wirksame Verdünnung/Konzentration der Prüfschubstanz, ist es zweckmäßig, den Versuch in zwei Schritten durchzuführen:

- ein Vorversuch zur akuten Toxizität wird nach ISO 11268-1 durchgeführt, um eine Angabe zur wirksamen Verdünnung/Konzentration zu erhalten, und der Verdünnung/Konzentration die keine Mortalität (NOEC) ergibt. Dann können die für die Hauptprüfung zu verwendenden Verdünnungen/Konzentrationen gewählt, d. h. eingegrenzt, werden;
- die Hauptprüfung in Bezug auf die Reproduktion zur Bestimmung der subletalen Wirkungen (der Verdünnungen) des verunreinigten Bodens oder der Konzentration einer Chemikalie, die nach gleichmäßigem Einmischen in den Standardboden zu keinen signifikanten Wirkungen auf die Anzahl der aus den Kokons geschlüpften Nachkommen im Vergleich zur Kontrolle (NOEC) zeigt sowie der niedrigsten wirksamen Konzentration (LOEC).