

DIN ISO 23265



ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2022-08-08

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
Verfahren zur Messung des Abbaus der organischen Substanz in
verunreinigten Böden (ISO/DIS 23265:2021);
Text Deutsch und Englisch**

Soil quality –

Test for estimating organic matter decomposition in contaminated soil
(ISO/DIS 23265:2021);

Text in German and English

Qualité du sol –

Essai d'estimation de la décomposition de la matière organique dans un sol contaminé
(ISO/DIS 23265:2021);

Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-04-08 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.

Gesamtumfang 47 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	4
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	10
5 Reagenzien und Materialien	10
6 Boden	11
6.1 Im Feld entnommener Boden	11
6.2 Kontrollboden	11
7 Prüfeinrichtung	12
8 Durchführung	12
8.1 Prüfaufbau	12
8.1.1 Allgemeines	12
8.1.2 Prüfaufbau bei chemisch aufgestocktem Boden	12
8.1.3 Prüfaufbau bei im Feld verunreinigtem Boden	13
8.2 Herstellung der Filtrierpapier-Scheiben	13
8.3 Vorbereitung des Bodens	14
8.3.1 Verunreinigter und Referenzboden	14
8.3.2 Zum Kontrollboden hinzugefügte chemische Substanzen	14
8.4 Prüfaufbau	15
8.5 Probennahme für die Prüfung	16
9 Gültigkeit der Prüfung	17
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	17
10.1 Berechnung	17
10.2 Angabe der Ergebnisse	17
11 Präzision	18
12 Statistische Auswertung	18
12.1 Allgemeines	18
12.2 Im Feld entnommener verunreinigter Boden	18
12.3 Chemisch aufgestockter Boden mit mehreren Konzentrationen	18
13 Prüfbericht	19
Anhang A (informativ) Bestimmung der Wasserhaltekapazität	20
A.1 Allgemeines	20
A.2 Prüfeinrichtung	20
A.3 Durchführung	20
A.4 Berechnung der Wasserhaltekapazität (WHC)	20
Anhang B (informativ) Leistungsfähigkeit des Verfahrens	21
B.1 Allgemeines	21
B.2 Prüfdurchlauf Phase 1	21
B.3 Prüfdurchlauf Phase 2	23
B.4 Prüfdurchlauf Phase 3	24
Literaturhinweise	25

Bilder

Bild 1 — Prüfeinheiten, die das zwischen 20 g Boden (Trockenmasse) angeordnete Filtrierpapier zeigen	16
Bild 2 — Beispiel für die Zersetzung von Filtrierpapier nach der Ofentrocknung, über die Inkubationsdauer	17
Bild B.1 — OMD-Ergebnisse für den LUFA-2.2-Kontrollboden	22

Tabellen

Tabelle B.1 — Vergleich der OMD-Ergebnisse zwischen den Laboratorien	22
--	----

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die deutsche Übersetzung der Internationalen Norm ISO/DIS 23265:2021, die vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ erarbeitet wurde.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Das internationale Dokument ISO/DIS 23265:2021 ist unverändert in diesen Norm-Entwurf übernommen worden.

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 11265	siehe	DIN ISO 11265
ISO 11274	siehe	DIN EN ISO 11274
ISO 11277	siehe	DIN ISO 11277
ISO 18512	siehe	DIN ISO 18512

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 11274, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren*
(ISO 11274:2019)

DIN ISO 11265, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit*
(ISO 11265:1994 + ISO 11265:1994/Corr.1:1996)

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

DIN ISO 18512, *Bodenbeschaffenheit — Anleitung für die Lang- und Kurzzeitlagerung von Bodenproben*
(ISO 18512:2007)

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

Die Bestimmung, ob die Lebensgemeinschaft von Bodenmikroorganismen gesund ist, ist eine komplexe Aufgabe und wird durch die Widerstandsfähigkeit und Belastbarkeit der Lebensgemeinschaft in Bezug auf Störungen beeinflusst [1]. Ganz einfach ausgedrückt, ist ein gesunder Boden ein Boden, der eine funktionierende Zersetzung von organischer Substanz (en: organic matter decomposition, OMD) und einen funktionierenden Nährstoffkreislauf aufweist. Tatsächlich wird eine Reihe von genormten Prüfverfahren benötigt, um die Ökologie der Lebensgemeinschaft von Bodenmikroorganismen und ihre Rolle für die Funktion und Textur des Bodens besser zu verstehen [2]. Eine wichtige mikrobiologische Funktion des Bodens ist wiederum die Zersetzung organischer Substanz. Leider mangelt es an genormten Verfahren zur quantitativen Messung dieses wichtigen Prozesses. Von daher erbringt die Fähigkeit von Bodenmikroorganismen, lignocellulosehaltiges Material zu zersetzen, den Nachweis, dass die mikrobiologische Population aktiv an der Zersetzung organischer Substanz und dem Kohlenstoffkreislauf beteiligt ist. Ein derzeit verfügbares Standardfeldverfahren zur Beurteilung der Hemmung der Zersetzung organischer Substanz im Boden durch Umweltkontaminanten besteht in der Verwendung von Netzbeuteln (Streubeuteln), die in Versuchsflächen angeordnet werden [3]; es steht jedoch kein Standardverfahren für die laborgestützte Bewertung der Zersetzung organischer Substanz zur Verfügung. Es wurde ein laborgestütztes Verfahren entwickelt, bei dem die gleichen Grundsätze wie beim Netzbeutel-Verfahren angewendet werden. Anstelle von natürlicher organischer Substanz (d. h. Baumblätter, Pflanzenmaterial usw.) wird in dem laborgestützten Verfahren jedoch leicht zugängliches Filtrierpapier als organisches Standardmaterial für Prüfungen der Zersetzung von organischer Substanz verwendet [4]. Das laborgestützte Verfahren wurde in mehreren Forschungsstudien als Teil einer größeren Reihe von Prüfungen zur Beurteilung der mikrobiellen Gesundheit des Bodens (en: soil microbial health, SMH) angewendet und beschrieben [5] [6]. In den Studien wurde die Auswirkung von Kontaminanten anhand von Altlastböden bewertet oder anhand von Böden, die für Untersuchungen zur Risikobeurteilung mit Chemikalien aufgestockt wurden.

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Auswirkungen von verunreinigten Böden auf den Abbau organischer Substanz (lignocellulosehaltiges Filtrierpapier) nach einer standardisierten Methode.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument bewertet die Lebensraumfunktion von Böden durch Bestimmung der Wirkungen von Kontaminanten und Substanzen im Boden auf die Zersetzung organischer Substanz. Diese Prüfung ist anwendbar auf natürliche Böden und Bodenmaterialien unbekannter Beschaffenheit (z. B. von verunreinigten Standorten, verbesserten Böden, Böden nach der Sanierung, landwirtschaftlichen oder anderen betroffenen Standorten). In diesem Verfahren können die Wirkungen von einzelnen Substanzen unter Verwendung eines natürlichen Standardbodens bewertet werden, der in Prüfungen mit chemischer Aufstockung eingesetzt wird. Bei verunreinigten Böden werden die Wirkungen im Prüfboden und in einem Kontrollboden bestimmt. In diesem Laborverfahren werden sterilisierte Scheiben aus Filtrierpapier als Quelle organischer Substanz verwendet. Die Zersetzung von organischer Substanz wird auf der Grundlage des Masseverlustes von Scheiben aus Filtrierpapier geschätzt, die zwischen zwei Schichten von Prüfboden angeordnet sind.

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

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

ANMERKUNG Die Stabilität der Prüfsubstanz kann im Prüfzeitraum nicht sichergestellt werden. Im Prüfverfahren sind keine Vorkehrungen zur Überwachung der Persistenz der zu prüfenden Substanz enthalten.

WARNUNG — Verunreinigte Böden können unbekannte Gemische von toxischen, radiotoxischen, genotoxischen, mutagenen oder auf andere Art schädlichen Chemikalien oder infektiöse Mikroorganismen enthalten. Berufsbedingte Gesundheitsrisiken können durch Staub oder verdunstete Chemikalien während der Handhabung und Inkubation auftreten. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um Hautkontakt zu vermeiden.

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 10390, *Soil, treated biowaste and sludge — Determination of pH*

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

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

ISO 11274, *Soil quality — Determination of the water-retention characteristic — Laboratory methods*

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 18512, *Soil quality — Guidance on long and short term storage of soil samples*

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

Kontaminant

Stoff oder Agens, der/das als Ergebnis menschlichen Wirkens im Boden vorhanden ist

3.2

EC_x (Wirkungskonzentration)

en **effective concentration**

Konzentration (Massenanteil) einer Untersuchungsprobe oder Prüfsubstanz, die x % einer Wirkung bei einem bestimmten Endpunkt innerhalb einer gegebenen Expositionsdauer hervorruft

Anmerkung 1 zum Begriff: Die EC_x wird als prozentualer Anteil des zu prüfenden Bodens (Trockenmasse) je Bodenge-misch (Trockenmasse) angegeben. Werden Substanzen geprüft, wird die EC_x als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse an Boden, in Milligramm je Kilogramm, angegeben. Das kann nur bei chemisch aufgestocktem Boden bestimmt werden.

3.3

Grenzwertprüfung

Prüfung mit einer Konzentration, die jeweils aus mindestens fünf Wiederholungen jeder der folgen-den Behandlungen besteht: i) Prüfboden oder die höchste Konzentration der Prüfsubstanz, die in den Kontrollboden gemischt wird, und ii) Kontrollboden

3.4

LOEC

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

en **lowest observed effect concentration**

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

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung wird die LOEC als Masse der Prüfsubstanz je Trockenmasse des zu prü-fenden Bodens angegeben. Alle Prüfkonzentrationen über der LOEC sollten üblicherweise eine Wirkung zeigen, die sich statistisch von der Kontrolle unterscheidet. Das kann nur bei chemisch aufgestocktem Boden bestimmt werden.

3.5

NOEC

Konzentration, bei der keine Wirkung zu beobachten ist

en **no observed effect concentration**

höchste Konzentration einer Prüfsubstanz unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der keine Wirkung beobachtet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: In dieser Prüfung zeigt die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer gege-be-nen Expositionsdauer keine statistisch signifikante Wirkung (Wahrscheinlichkeit $p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. Das kann nur bei chemisch aufgestocktem Boden bestimmt werden.

3.6

Referenzboden

nicht verunreinigter Boden mit vergleichbaren pedologischen Eigenschaften (Nährstoffkonzentrationen, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff und Textur) wie der zu untersuchende *Prüfboden* (3.8)

3.7

Kontrollboden

als Kontrolle gegenüber chemisch aufgestocktem *Prüfboden* (3.8) verwendeter *Referenzboden* (3.6), der die Gültigkeitskriterien erfüllt

Anmerkung 1 zum Begriff: Es ist ratsam, die Eignung des Kontrollbodens vor der Hauptprüfung nachzuweisen, indem gezeigt wird, dass die prüfungsbezogenen Gültigkeitskriterien der Norm mit dem Boden erfüllbar sind.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Kontrollboden kann kein künstlicher Boden (en: artificial soil, AS) sein, da bekannt ist, dass dieser Bodentyp die Gültigkeitskriterien der Prüfung nicht erfüllt.

3.8

Prüfboden

Probe von im Feld entnommenem oder chemisch aufgestocktem Boden, der auf Toxizität für die Lebensgemeinschaft von Bodenmikroorganismen zu bewerten ist

4 Kurzbeschreibung

Die Fähigkeit von Bodenmikroorganismen, Filtrierpapier aus Cellulose (d. h. organische Substanz) im Prüfboden (d. h. verunreinigten Boden) abzubauen, wird mit dem gleichen Filtrierpapier aus Cellulose in Kontroll- oder Referenzboden über eine bestimmte Inkubationsdauer verglichen. Der Prüfboden kann von einem kontaminierten Standort stammen oder ein mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Kontaminanten aufgestocker Kontrollboden sein. Wenn der Kontaminant auf irgendeine Weise die Fähigkeit von Bodenmikroorganismen, Filtrierpapier aus Cellulose durch Enzyme des Kohlenstoffkreislaufs abzubauen, beeinträchtigt, wird zwischen dem Prüfboden und den Kontrollbehandlungen ein Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit beobachtet. Filtrierpapier wurde als Prüfmaterial für organische Substanz gewählt, denn es ist universell verfügbar, es handelt sich um ein standardisierteres Material, es ermöglicht eine bessere laborübergreifende Reproduzierbarkeit, es ist sterilisierbar (z. B. autoklavierbar) und es kann leicht von natürlich vorkommender organischer Substanz im Boden unterschieden werden [4] [9].

Die Prüfung umfasst das Vorwägen von Scheiben aus Filtrierpapier, die Zugabe von 10 g Boden bezogen auf die Trockenmasse in ein steriles 50-ml-Zentrifugenröhrchen, das Anordnen des Filtrierpapiers auf dem Boden, die Zugabe von weiteren 10 g Boden (Trockenmasse) auf das Filtrierpapier, das lose Verschließen des Röhrchens und die Inkubation bei einer konstanten Temperatur (z. B. Raumtemperatur, $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Bei einem Prüfaufbau mit Kontrolle im Vergleich zum beeinflussten Boden wird die Prüfung mit mindestens fünf Wiederholungen für jede Behandlung und mit mindestens 5 Zeiträumen bis zur zerstörenden Entnahme durchgeführt. Die Inkubationsdauer hängt von der Abbaugeschwindigkeit des Filtrierpapiers ab, folglich wird die Prüfdauer durch das Ausmaß des Masseverlusts an Filtrierpapier bei der Kontrollbehandlung bestimmt. Die verschiedenen Längen der Zeiträume bis zur zerstörenden Entnahme hängen vom Grad der mikrobiellen Aktivität im Kontroll- oder Referenzboden ab.

Falls der Boden mit einem Kontaminanten aufgestockt wird, ist eine erste Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs unter Verwendung eines breiten Konzentrationsbereichs des Kontaminanten ratsam. Für die endgültige Verdünnungsreihe der Chemikalie werden mindestens 5 Prüfkonzentrationen empfohlen. Die Dauer der Prüfung wird durch die Kontrolle und die zur Beobachtung einer deutlichen dosisabhängigen Wirkung benötigten Zeit beeinflusst. Erfahrungsgemäß sollte die Prüfung nicht länger als 140 Tage dauern.

5 Reagenzien und Materialien

5.1 Reagenzien

5.1.1 Steriles deionisiertes (oder destilliertes) Wasser

5.2 Materialien

5.2.1 50-ml-Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (steril)

5.2.2 Filtrierpapier aus Cellulose, Rückhaltevermögen für Partikel $\geq 11 \mu\text{m}$ bis $25 \mu\text{m}$, Dicke $\sim 180 \mu\text{m}$, Aschegehalt $\sim 0,06 \%$ (steril)

5.2.3 Lochstanzer (Durchmesser 25 mm)

5.2.4 Pinzette für das Filtrierpapier (steril)

5.2.5 Petrischalen (Glas oder Kunststoff)

5.2.6 Kleine Pinsel (weiche Borsten)

5.2.7 Große Wägeschiffchen aus Kunststoff oder alternative Gefäße

5.2.8 Kleine Wägeschiffchen aus Aluminium oder alternative Gefäße

6 Boden

6.1 Im Feld entnommener Boden

Im Feld entnommene Böden, verunreinigte Böden und Kontrollböden (d. h. Referenzböden) können von industriellen, landwirtschaftlichen Standorten, borealen Waldstandorten und anderen interessierenden Altlaststandorten erhalten werden. Bei ungestörtem Boden wird der organische Horizont verwendet. Der Boden wird an das Laboratorium versendet und bei 4°C gelagert.

Sämtliche im Feld entnommenen Böden müssen durch ein 2-mm-Sieb gegeben werden. Falls erforderlich, können die Böden gerade soweit leicht luftgetrocknet werden, dass das Sieben ermöglicht wird; nach Möglichkeit sollte das Lufttrocknen aber vermieden werden. Nach dem Sieben wird jede Bodenart auf einer Plane verteilt und durch Umschlagen der Plane auf sich selbst homogenisiert (ISO 18512). Dann wird der Boden erneut bei 4°C gelagert. Der Boden sollte in Behältern gelagert werden, die die Verluste an Bodenkontaminanten durch Verflüchtigung und Sorption an den Behälterwänden minimieren. Bei dieser Prüfung sind unterschiedliche Lagerzeiten möglich, solange im Kontroll- oder Referenzboden mikrobielle Aktivität nachweisbar ist, die den Gültigkeitskriterien der Prüfung entspricht. pH-Wert, Leitfähigkeit, Feuchtegehalt und Wasserhaltekapazität (en: water holding capacity, WHC) des Bodens werden nach den nachstehend angeführten Verfahren bestimmt.

Zur Auswertung der Prüfergebnisse müssen für jeden von einem Standort im Freiland entnommenen Boden die folgenden Kennwerte bestimmt werden:

- a) pH-Wert nach ISO 10390,
- b) Bodentextur (Sand, Lehm, Schluff) nach ISO 11277,
- c) Wassergehalt nach ISO 11465,
- d) organischer Kohlenstoff nach ISO 10694,
- e) Wasserhaltekapazität, Anhang A.

ANMERKUNG Es ist wichtig, die WHC von allen in der Prüfung verwendeten Gemischen zu bestimmen.

6.2 Kontrollböden

Der Kontrollboden (3.7) kann im Zusammenhang mit der Bewertung von verunreinigtem Boden der Referenzböden (3.6) sein. Referenzböden von einer nicht kontaminierten Fläche in der Nähe eines Standortes mit verunreinigtem Boden sollten auf ähnliche Weise wie die verunreinigten Prüfböden gehandhabt, versendet und charakterisiert werden. Im Fall einer Untersuchung von chemisch aufgestocktem Boden wird ein bekannter Kontrollboden verwendet.

7 Prüfeinrichtung

Laborausrüstung und Folgendes ist zu verwenden.

7.1 Oberschalige Waage

7.2 Gerät zum Bestimmen der Trockenmasse des Substrats nach ISO 11465 (Trockenschrank, Exsikkator, Analysenwaage).

7.3 Digitalkamera (optional)

7.4 Trockenmittelkammer

7.5 pH-Messgerät

7.6 Analysenwaage, mit einer Wägegenauigkeit von $\pm 0,000$ 1 g

7.7 Trockenschrank, auf (105 ± 5) °C eingestellt.

7.8 Prüfumgebung

7.8.1 Bereich zur Aufrechterhaltung einer sterilen Umgebung, Werkbank mit Bunsenbrenner oder biologische Sicherheitswerkbank (optional).

7.8.2 Abgeschlossene Prüfkammer (Brutschrank), regelbar auf eine konstante Temperatur.

8 Durchführung

8.1 Prüfaufbau

8.1.1 Allgemeines

Eine Probe von im Feld entnommenem verunreinigtem Boden mit einer einzelnen Konzentration oder ein chemisch aufgestockter Boden mit mehreren Konzentrationen wird mit einem geeigneten Referenz- oder Kontrollboden verglichen. Die verschiedenen Prüfaufbauten sind nachstehend beschrieben. Allerdings sind ungeachtet des gewählten Prüfaufbaus für jede Prüfkonzentration und den zugehörigen Kontrollboden fünf Wiederholungen durchzuführen, um die zeitlich gestaffelte Probenahme während der Durchführungsdauer dieser Prüfnorm zu ermöglichen. Eine Scheibe aus Filtrierpapier (d. h. organische Substanz) wird zu dem Prüfboden gegeben und der Masseverlust des Filtrierpapiers wird über eine bestimmte Inkubationsdauer bestimmt.

8.1.2 Prüfaufbau bei chemisch aufgestocktem Boden

a) Ermittlung des Konzentrationsbereichs

Es wird eine Vorprüfung empfohlen, um den Konzentrationsbereich zu ermitteln, der den Wirkungsbereich einer neuen Prüfsubstanz einschließt (z. B. 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg und 1 000 mg/kg). Eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs muss mit der gleichen Bodencharge wie die geplante Hauptprüfung durchgeführt werden. Die Prüfung kann mit einer verringerten Anzahl von Wiederholungen (z. B. 2 oder 3 Wiederholungen) im Vergleich zur Hauptprüfung durchgeführt werden. Die Zeitdauer der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs wäre gleich der Zeitdauer der Hauptprüfung. Der Konzentrationsbereich in der Hauptprüfung sollte vorzugsweise so gewählt werden, dass er Konzentrationen einschließt, die einen weiten Bereich umfassen, einschließlich einer niedrigen Konzentration, die keine nachteiligen Wirkungen hervorruft (ähnlich zur negativen Kontrollbehandlung), und einer hohen Konzentration, die zu schädigenden Wirkungen führt. Idealerweise würden die gewählten Konzentrationen auch die Wirkungen im mittleren Bereich einschließen, damit die EC50-Wirkungskonzentration besser abschätzbar ist.

Wenn bei der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs weder mit einer zu 100 % verunreinigten Bodenprobe noch bei einer Prüfung mit Chemikalienaufstockung eine Wirkung beobachtet wird, kann die Hauptprüfung als Grenzwertprüfung (z. B. mit unverdünntem verunreinigtem Feldboden) oder mit einer spezifischen hohen chemischen Konzentration (z. B. 1 000 mg Prüfsubstanz/kg Prüfboden) ausgelegt werden.

b) Chemisch aufgestockter Boden

Falls der Boden mit verschiedenen Konzentrationen chemischer Substanzen aufgestockt wird, kann die Prüfung für die folgenden beiden Szenarien ausgelegt werden:

- 1) Bei der Vorgehensweise mit EC_x müssen mindestens 5 Konzentrationen plus die Kontrollbehandlung(en) verwendet werden, und mehr (d. h. ≥ 10 Konzentrationen plus Kontrollen) werden empfohlen, um die Wahrscheinlichkeit der Eingabelung (Einschließung) aller gesuchten Endpunkte nach ISO 10694 zu erhöhen. Der Verdünnungsfaktor kann variabel sein; kleiner bei geringeren Konzentrationen, größer bei höheren Konzentrationen. Es werden mindestens fünf Wiederholungen für jede Behandlung plus die Kontrollen empfohlen.
- 2) Bei der Vorgehensweise mit NOEC-Hypothese müssen mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe nach ISO 10694 verwendet werden. Es werden fünf Wiederholungen für jede Behandlung plus acht Kontrollen empfohlen.

Unabhängig vom gewählten Prüfaufbau dürfen die Abstufungen der Prüfkonzentrationen den Verdünnungsfaktor 2 nicht überschreiten.

Eine Grenzwertprüfung kann ausreichend sein, wenn die Ergebnisse der Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs keine toxische Wirkung zeigen. Diese würde eine einzelne Prüfkonzentration (z. B. 1 000 mg/kg) und die Kontrolle mit mindestens fünf Wiederholungen für jede Behandlung umfassen.

8.1.3 Prüfaufbau bei im Feld verunreinigtem Boden

Wenn ein im Feld entnommener verunreinigter Boden geprüft werden soll, sollte der Referenzboden mit dem Prüfboden so genau wie möglich übereinstimmen. Es wird eine vorausgehende Funktionsprüfung empfohlen, um sicherzustellen, dass der Referenzboden die Gültigkeitskriterien erfüllt. Es sind mindestens fünf Wiederholungen sowohl für den Referenzboden als auch für den Prüfboden erforderlich, es werden aber mehr (d. h. ≥ 10 Wiederholungen) empfohlen.

ANMERKUNG Bei Böden, die aus verschiedenen Horizonten (z. B. boreale oder Taigaböden) entnommen wurden, muss jeder Horizont getrennt in unabhängigen Hauptprüfungen geprüft werden.

8.2 Herstellung der Filtrierpapier-Scheiben

Scheiben aus Filtrierpapier werden mit einem Lochstanzer mit einem Durchmesser von 25 mm aus handelsüblichem Filtrierpapier geschnitten (d. h. so bemessen, dass sie in die sterilen Zentrifugenröhrchen (5.2.1) passen), oder sie dürfen bereits in dieser Größe erworben werden. Es ist sicherzustellen, dass der Schnitt sauber ist und keine ausgefranzten Ränder aufweist. Die einzelnen Filtrierpapier-Scheiben werden anschließend auf einer Analysenwaage auf 0,001 g gewogen und die Massen werden aufgezeichnet. Es wird auch empfohlen, die Masse mit einem Bleistift direkt auf das Filtrierpapier zu schreiben. Die Filtrierpapiere, üblicherweise jeweils 10, werden mit Aluminiumfolie umwickelt und in einem Trockenzyklus für 20 min (121 °C und 100 kPa) autoklaviert (sterilisiert) oder in einem Trockenschrank bei 160 °C für 2 h erhitzt. Die im Prüfverfahren verwendete Filterpinzette wird ebenfalls mit Aluminiumfolie umwickelt und auf gleiche Weise sterilisiert.

8.3 Vorbereitung des Bodens

8.3.1 Verunreinigter und Referenzboden

Der verunreinigte Prüfboden und der Referenzboden müssen auf die gleiche Weise behandelt werden. Die Gesamtmasse des zu prüfenden Bodens und des Referenzbodens muss in jedem Prüfbehälter das Trockenmasseäquivalent von 20 g sein. Der Prüfboden muss mit sterilem deionisiertem Wasser befeuchtet werden, um 40 % bis 60 % der Gesamtwasserhaltekapazität (d. h. den gewünschten WHC-Wert) oder eine krümelige Textur (d. h. Klumpen von 2 bis 3 mm) zu erreichen, die optimal für die Prüfung ist, bestimmt nach Anhang A. In einigen Fällen, wenn z. B. Waldböden geprüft werden, sind möglicherweise höhere oder niedrigere Prozentanteile erforderlich. Die optimale prozentuale Wasserhaltekapazität sollte vor dem Prüfaufbau bestimmt werden.

Am Anfang und am Ende der Prüfung wird für jeden Prüf- und Referenzboden (ein Behälter je Konzentration) der pH-Wert nach ISO 10390 bestimmt (wenn saure oder basische Substanzen geprüft werden, ist der pH-Wert nicht einzustellen).

WARNUNG — Verunreinigte Böden können unbekannte Gemische von toxischen, radiotoxischen, genotoxischen, mutagenen oder auf andere Art schädlichen Chemikalien oder infektiöse Mikroorganismen enthalten. Berufsbedingte Gesundheitsrisiken können durch Staub oder verdunstete Chemikalien während der Handhabung und Inkubation auftreten. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um Hautkontakt zu vermeiden.

8.3.2 Zum Kontrollboden hinzugefügte chemische Substanzen

Zur Herstellung des Prüfbodens wird Kontrollboden verwendet. Es wird ausreichend Prüfboden und Kontrollboden, bestimmt durch Summierung der erforderlichen Masse für alle Wiederholungen und Probenahmen, vorbereitet (mindestens 500 g Trockenmasse). Die Substanzen werden zum Prüfsubstrat hinzugefügt und gründlich gemischt.

Für das Einbringen der Prüfsubstanzen wird entweder Verfahren a), b) oder c) entsprechend angewendet:

a) Wasserlösliche Substanz

- Unmittelbar vor dem Befeuchten des Bodens bis zur gewünschten WHC für die Prüfung (siehe 8.3.1) wird die Prüfsubstanzmenge in einer Menge an sterilem Wasser gelöst, die unterhalb der Menge liegt, die erforderlich ist, um den Boden auf die gewünschte WHC zu bringen, und zu dem Prüfboden hinzugefügt. Der Behälter wird mit sterilem Wasser gespült, um den Boden auf die gewünschte WHC zu bringen und zum Prüfboden hinzuzufügen. Der Prüfboden wird gründlich gemischt, bevor er in die jeweiligen Prüfbehälter eingebracht wird. Dieser Vorgang wird für jede Prüfkonzentration wiederholt.

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

- Die zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderliche Menge der Prüfsubstanz wird in einem flüchtigen Lösemittel (wie z. B. Aceton oder Hexan) gelöst und zu einem Anteil des Prüfbodens gegeben. Nach dem Verdunsten des Lösemittels durch Anordnen des Behälters unter einem Abzug wird die verbleibende Menge Prüfboden hinzugefügt und gründlich vermischt. Steriles Wasser wird hinzugefügt, um den Prüfboden auf die gewünschte WHC zu bringen, der Boden wird erneut gründlich gemischt, bevor er in die Prüfbehälter eingebracht wird. In diesem Fall ist eine zusätzliche Kontrolle mit genau dem Lösemittel erforderlich. Dieser Vorgang wird für jede Prüfkonzentration wiederholt.

ANMERKUNG Ultraschalldispersion, organische Lösemittel, Emulgatoren oder Dispergiermittel können verwendet werden, um Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit zu dispergieren. Bei Verwendung solcher Hilfssubstanzen sollten alle Prüfkonzentrationen sowie eine zusätzliche Kontrolle die gleiche Mindestmenge an Hilfssubstanz enthalten.

WARNUNG — Geeignete Vorsichtsmaßnahmen sind zu treffen, um beim Umgang mit Lösemitteldämpfen Gefahren durch Inhalation oder Explosion und Schäden an den Extraktionsgeräten, Pumpen usw. zu vermeiden.

c) In Wasser oder organischen Lösemitteln unlösliche Substanzen

- Bei einer in Wasser oder einem flüchtigen Lösemittel unlöslichen Substanz werden 10 g Trockenmasse des Kontrollbodens vorbereitet und die zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderliche Prüfsubstanzmenge wird direkt zum Boden hinzugefügt und gründlich vermischt. Diese „Trockenmischung“ wird zu dem restlichen Prüfboden hinzugefügt und gründlich vermischt. Steriles Wasser wird hinzugefügt, um den Prüfboden auf die gewünschte WHC zu bringen, der Boden wird erneut gründlich gemischt, bevor er in die Prüfbehälter eingebracht wird. Dieser Vorgang wird für jede Prüfkonzentration wiederholt.

In das Substrat eingemischte Substanzen brauchen in Konzentrationen über 1 000 mg/kg trockener Boden der Untersuchungsprobe nicht geprüft zu werden.

Die Prüfung wird gleichzeitig mit allen Wiederholungen je Konzentration und der (den) nach der gewählten Vorgehensweise erforderlichen Kontrolle(n) fortgesetzt.

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

8.4 Prüfaufbau

Da der Grad der biologischen Aktivität sich bei den verschiedenen bewerteten Böden unterscheidet, sind die Prüfeinheiten für jede Bodenprobe so aufgebaut, dass zerstörende Probenahmen zu mindestens 5 Zeitpunkten bei 5 Wiederholungen für jede Konzentration und jeden Kontrollboden möglich sind. Der Abstand zwischen den Zeitpunkten unterscheidet sich je nach dem geprüften Boden, liegt aber vorzugsweise zwischen 7 und 28 Tagen. Bei Langzeitprüfungen (z. B. bis zu 140 Tagen) können zusätzliche Prüfeinheiten zum Prüfaufbau hinzugefügt werden. Wenn jedoch eine Prüfung zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs durchgeführt wurde, lässt sich aus den Ergebnissen möglicherweise schließen, dass nur 3 oder 4 Zeitpunkte für die Hauptprüfung dieses Prüfbodens erforderlich sind.

Prüfeinheiten sollten in einer biologischen Sicherheitswerkbank (en: biological safety cabinet, BSC) oder einer sterilen Umgebung durch Zugabe von 10 g (Trockenmasse) befeuchtetem Prüfboden und Referenz- oder Kontrollboden in sterile 50-ml-Zentrifugenröhrchen vorbereitet werden. Dann wird leicht an den Röhrchen geklopft, damit sich die erste Bodenschicht absetzen kann. Als nächstes wird eine zuvor gewogene sterile Filtrierpapier-Scheibe aus Cellulose (Durchmesser 25 mm) mit einer sterilen Pinzette auf dem Boden angeordnet. Weitere 10 g (Trockenmasse) Boden (Prüf-, Referenz- oder Kontrollboden) werden auf das Filtrierpapier gegeben und es wird erneut leicht an den Röhrchen geklopft, damit sich der Boden absetzt (Bild 1).