

	<p style="text-align: center;">Bodenbeschaffenheit</p> <p style="text-align: center;"><b>Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer</b></p> <p style="text-align: center;">Teil 3: Anleitung für die Bestimmung von Wirkungen unter Freilandbedingungen (ISO 11268-3 : 1999)</p>	<b>DIN</b> <b>ISO 11268-3</b>
--	--	----------------------------------

ICS 13.080.030

Soil quality —  
Effects of pollutants on earthworms —  
Part 3: Guidance of the determination of effects in field situations  
(ISO 11268-3 : 1999)  
Qualité du sol —  
Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre —  
Partie 3: Lignes directrices relatives a la détermination des effets sur site  
(ISO 11268-2 : 1999)

**Die Internationale Norm ISO 11268-3 : 1999-04-01 „Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations“ ist unverändert in diese Deutsche Norm übernommen worden.**

### Nationales Vorwort

Diese Internationale Norm wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Bodenbeschaffenheit“ aufgestellt. Für Deutschland war der NAW I B 4 „Boden — Biologische Bodenuntersuchungsverfahren“ an der Bearbeitung beteiligt. Es ist erforderlich, bei den Arbeiten nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten. Für die in Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10390 siehe DIN ISO 10390  
ISO 10694 siehe DIN ISO 10694  
ISO 11274 siehe E DIN ISO 11274  
ISO 11277 siehe E DIN ISO 11277

### Nationaler Anhang NA (informativ)

#### Literaturhinweise

DIN ISO 10390  
Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes (ISO 10390 : 1994)  
DIN ISO 10694  
Bodenbeschaffenheit — Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse) (ISO 10694 : 1995)  
E DIN ISO 11274  
Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren (ISO/DIS 11274 : 1992)  
E DIN ISO 11277  
Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in Mineralböden — Verfahren durch Sieben und Sedimentation nach Entfernen der löslichen Salze, der organischen Substanz und der Carbonate (ISO/DIS 11277 : 1994)  
DIN 19686  
Vegetationskundliche Standortuntersuchung im Landwirtschaftlichen Wasserbau — Methodik

Fortsetzung Seite 2 bis 7

## Deutsche Übersetzung

Bodenbeschaffenheit

# Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer

Teil 3: Anleitung für die Bestimmung von Wirkungen unter Freilandbedingungen

## Inhalt

	Seite		Seite
<b>Vorwort</b> .....	2	<b>6 Versuchsvorbereitung</b> .....	3
<b>Einleitung</b> .....	2	6.1 Versuchsstandort .....	3
<b>1 Anwendungsbereich</b> .....	3	6.2 Effizienzkontrolle des Extraktionsverfahrens ...	5
<b>2 Normative Verweisungen</b> .....	3	<b>7 Versuchsdurchführung</b> .....	5
<b>3 Einheiten</b> .....	3	7.1 Applikation der Prüfsubstanz .....	5
<b>4 Grundlage des Verfahrens</b> .....	3	7.2 Probenahmetermine .....	5
<b>5 Erfassungsmethoden</b>		7.3 Referenzsubstanz .....	5
<b>für Regenwurmpopulationen</b> .....	3	<b>8 Versuchsauswertung</b> .....	6
5.1 Allgemeines .....	3	8.1 Identifizierung der Regenwurmart .....	6
5.2 Formaldehyd-Austreibung .....	3	8.2 Gewichtsbestimmung .....	6
5.3 Austreibung mit Senf .....	3	<b>9 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse</b> ..	6
5.4 Elektrische Extraktion .....	3	<b>10 Prüfbericht</b> .....	6
		<b>Literaturhinweise</b> .....	7

## Vorwort

Die ISO (Internationale Organisation für Normung) ist die weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedskörperschaften). Die Erarbeitung Internationaler Normen obliegt den Technischen Komitees der ISO. Jede Mitgliedskörperschaft, die sich für ein Thema interessiert, für das ein Technisches Komitee eingesetzt wurde, ist berechtigt, in diesem Komitee mitzuarbeiten. Internationale (staatliche und nichtstaatliche) Organisationen, die mit der ISO in Verbindung stehen, sind an den Arbeiten ebenfalls beteiligt. Die ISO arbeitet bei allen Angelegenheiten der elektrotechnischen Normung eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen. Die von den Technischen Komitees verabschiedeten internationalen Norm-Entwürfe werden den Mitgliedskörperschaften zur Abstimmung vorgelegt. Die Veröffentlichung als Internationale Norm erfordert Zustimmung von mindestens 75 % der abstimmenden Mitgliedskörperschaften.

Die Internationale Norm ISO 11268-3 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Bodenbeschaffenheit“, Unterkomitee SC 4 „Biologische Verfahren“ erarbeitet.

ISO 11268 besteht aus folgenden Teilen, die unter dem allgemeinen Titel „Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*)“ veröffentlicht werden:

- Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat
- Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung
- Teil 3: Anleitung für die Bestimmung von Wirkungen unter Freilandbedingungen.

## Einleitung

Die vorliegende Anleitung beschreibt einen Untersuchungsplan mit dem Ziel der Ermittlung von Wirkungen einer Substanz auf Regenwurmart unter Freilandbedingungen. Wegen der Komplexität von Freilandversuchen kann diese Anleitung unter verschiedenen Gesichtspunkten nur empfehlenden Charakter haben, da je nach den Voraussetzungen am Standort Anpassungen notwendig sind.

Diese Anleitungen wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse und Empfehlungen des internationalen Workshops „Ecotoxicology of Earthworms“ erstellt, der in Sheffield, Vereinigtes Königreich, im April 1991 durchgeführt wurde (siehe Literaturhinweise).

## 1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 11268 beschreibt Verfahren zur Bestimmung der Wirkung von Stoffen auf Regenwürmer im Freiland. Er dient als Grundlage zur Bestimmung der Wirkung von Chemikalien, die auf den Boden aufgebracht oder in den Boden eingearbeitet sind.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Verweisung in diesem Text Bestandteil der vorliegenden Internationalen Norm sind. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Internationalen Norm waren die angegebenen Ausgaben gültig. Alle normativen Dokumente unterliegen der Überarbeitung. Vertragspartner, deren Vereinbarungen auf dieser Internationalen Norm basieren, werden gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, ob die jeweils neuesten Ausgaben der im folgenden genannten Normen angewendet werden können. Die Mitglieder von IEC und ISO führen Verzeichnisse der gegenwärtig gültigen Internationalen Normen.

ISO 10390 : 1994

Soil quality — Determination of pH

ISO 10694 : 1995

Soil quality — Determination of organic and total carbon after dry combustion (elemental analysis)

ISO 11274 : 1998

Soil quality — Determination of the water retention characteristics — Laboratory methods

ISO 11277 : 1998

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

## 3 Einheiten

Die Aufwandmenge der Prüfsubstanz ist in Kilogramm je Hektar (kg/ha) oder in Liter je Hektar (l/ha) anzugeben. Wenn es sich bei der Prüfsubstanz um formuliertes Material handelt, dann ist die Aufwandmenge als Massenanteil des aufgetragenen Wirkstoffes anzugeben.

## 4 Grundlage des Verfahrens

Während der Prüfung werden auf den mit der Prüfsubstanz behandelten Probeflächen, auf Kontroll- sowie mit einem toxischen Standard behandelten Flächen Art und Anzahl der abgesammelten Regenwürmer bestimmt und verglichen. Die Prüfdauer hängt von den Eigenschaften der Prüfsubstanz ab und beträgt üblicherweise ein Jahr. Die Probenahmeterminen müssen in der Aktivitätsphase der Regenwürmer liegen.

Die Probenahme erbringt eine relative Anzahl von Regenwürmern, eine Bestimmung ihrer absoluten Anzahl ist nicht notwendig. Die Prüfung ist als vollständig randomisierter Parzellenversuch mit vier Wiederholungen anzulegen. Zur Bestimmung der Wirkung der Behandlung werden die zu den einzelnen Probenahmen gesammelten Regenwurmzahlen einer statistischen Analyse zugeführt.

ANMERKUNG: Sofern es die jeweilige Fragestellung erfordert, kann mit den über das beschriebene Verfahren gewonnenen Regenwurmproben von behandelten Versuchsfeldern auch eine Rückstandsanalyse durchgeführt werden.

## 5 Erfassungsmethoden für Regenwurmpopulationen

### 5.1 Allgemeines

Aufgrund der Notwendigkeit, eine große Probenzahl innerhalb kürzester Zeit zu nehmen, sind mechanische Extraktionsverfahren, wie Handauslese, Auswaschung oder Siebflotation in der Regel zu aufwendig. Mechanische Extraktionsverfahren stellen eine Möglichkeit dar, auch dann Proben zu nehmen, wenn die Tiere aufgrund der Witterung nicht aktiv sind, jedoch ist hiermit in der Regel nur eine eingeschränkte Probenahme möglich.

Für die Zwecke des hier beschriebenen Verfahrens können daher im wesentlichen die Formaldehyd-Austreibung (Raw 1959) und die elektrische Austreibung nach dem Oktett-Verfahren (Thielemann 1986, Cuendet et al. 1991) angewendet werden. Diese Extraktionsverfahren sind nur anwendbar, wenn die Regenwürmer aktiv sind. Zur Steigerung der Effizienz können beide Verfahren mit einer Handauslese kombiniert werden (Lee 1985).

Die Einzelproben sind zufällig über die Versuchsparzelle verteilt zu nehmen.

### 5.2 Formaldehyd-Austreibung

Zur Formaldehyd-Austreibung werden 5 l/0,25 m<sup>2</sup> bis 10 l/0,25 m<sup>2</sup> einer 0,2 %igen Formaldehydlösung je nach Sickervermögen in 2 bis 3 Schüben gleichmäßig auf die Probefläche gegossen. Die Gesamtdauer der Austreibung beträgt 30 min.

Alle innerhalb der Probefläche an die Bodenoberfläche kommenden Regenwürmer werden aufgesammelt und in Konservierungsflüssigkeit (5 % Formol oder 70 % Alkohol) (siehe 8.1) überführt. Nach 30 min Extraktionszeit werden Bodenoberfläche und Grasdecke intensiv abgesucht, um bisher übersehene Tiere (meist kleine Jungtiere und die schlanke Art *Aporrectodea rosea*) aufzusammeln.

### 5.3 Austreibung mit Senf

Am Vortag der Austreibung werden 60 g Senfpulver mit 1 l destilliertem Wasser vermischt. Direkt vor der Verwendung wird diese Senfemulsion zu 9 l destilliertem Wasser gegeben und in gleicher Weise wie die Formaldehydlösung appliziert. Die weitere Vorgehensweise entspricht der Formaldehyd-Austreibung nach 5.2.

### 5.4 Elektrische Extraktion

Grundsätzlich werden Elektroden an den Ecken einer Probefläche in den Boden gesteckt, und Würmer kommen nach Einschalten des elektrischen Stroms an die Oberfläche. Für die elektrische Austreibung gibt es eine Reihe von Extraktionsgeräten unterschiedlicher technischer Ausführung (Gleichstrom oder Wechselstrom, Elektrodeneinstichtiefe, Segmentierung der Elektroden usw.). Die Spezifikation der Geräte und die Prüfbedingungen sollten daher aufgezeichnet werden. Die Gesamtdauer der Austreibung beträgt 30 min. Nach Beendigung der 30-minütigen Extraktionszeit sollte die Bodenoberfläche intensiv nach übersehenen Tieren abgesucht werden.

## 6 Versuchsvorbereitung

### 6.1 Versuchsstandort

#### 6.1.1 Auswahl und Beschreibung

Der Versuch ist auf einer für die zu untersuchende Prüfsubstanz geeigneten Fläche durchzuführen, die mit Flächen vergleichbar ist, auf denen üblicherweise die