



# Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung



## Regenwurm (*Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea longa*)

Diana Teubner, Martin Paulus, Kathrin Tarricone, Roland Klein

Universität Trier, FB VI – Biogeographie  
Universitätsring 15, D-54286 Trier

### Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Umweltprobenbank des Bundes</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung dieser Richtlinie</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Funktion der Probenart</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>Zielkompartimente</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Festlegungen für die Probenahme</b>	<b>3</b>
5.1	Artbestimmung	3
5.2	Auswahl und Abgrenzung der Probenahmefflächen, Auswahl der Probenart	3
5.3	Auswahl der Individuen und Stichprobengröße	4
5.4	Probenahmezeitraum und -häufigkeit	4
5.5	Gebietsbezogener Probenahmeplan	5
<b>6</b>	<b>Durchführung der Probenahme</b>	<b>5</b>
6.1	Technische Vorbereitungen	5
6.2	Erforderliche Ausrüstung und Reinigungsvorschriften	5
6.3	Probenahmetechnik	6
<b>7</b>	<b>Biometrische Probencharakterisierung</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>8</b>

### Anhang: Checkliste zur Vorbereitung und Durchführung der Probenahme

**Sicherheitsrichtlinie für den Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom für die Umweltprobenbank**

**Probendatenblätter**

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Humanproben**

Stand: November 2018, V 2.0.1

# 1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) unter fachlicher und administrativer Koordination des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe.

Grundlage des Betriebs der UPB sind spezifische Verfahrensrichtlinien sowie die Konzeptionen der UPB (Umweltbundesamt 2008, 2014).

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter [www.umweltprobenbank.de](http://www.umweltprobenbank.de) verfügbar.

## 2 Zielsetzung dieser Richtlinie

Die Probenahme ist der erste und wichtigste Schritt zur Sicherung der Proben- und Datenqualität. Sie erfolgt nach fachlich begründeten und standardisierten Methoden, um Kontaminationen zu minimieren und den Verlust von chemischen Informationen zu vermeiden. Der besonders hohe Anspruch an Qualitätssicherung ergibt sich aus der außergewöhnlichen Bedeutung der Proben als Archivmaterial. Repräsentativität und Reproduzierbarkeit der Proben sind Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse in Zeit und Raum.

Die vorliegende Richtlinie stellt die Fortschreibung der Fassung von Quack *et al.* (2003) dar.

Der Transport und die weiterführende Probenbearbeitung, die Lagerung sowie die chemische Charakterisierung hat nach den gültigen Richtlinien der UPB zu erfolgen.

## 3 Funktion der Probenart

Tiefgrabende (anecische, anözische oder anekti-sche) Regenwürmer sind als bodenbewohnende Organismen auf sehr unterschiedliche Weise an den komplexen Prozessen der Bodenentwicklung beteiligt und nehmen als Saprophyten eine zentrale Stellung bei der Umsetzung von organischer Materie und der daran gebundenen Energie (Destruktion) ein. Von ihren zahlreichen Funktionen seien hier nur einige der wichtigsten aufgelistet:

- Sie zerkleinern die jährlich anfallende Streu mechanisch und spalten die Makromoleküle hydrolytisch auf.
- Sie arbeiten die zerkleinerten oberirdischen Pflanzenreste in die tieferen Bodenschichten ein und erhöhen dadurch die Bodenfruchtbarkeit.
- Durch das Anlegen von Wohnröhren und die Kotablage an der Bodenoberfläche lockern sie das Bodengefüge auf und verbessern der Humusform, was die Durchwurzelbarkeit des Bodens fördert.
- Durch die Anlage eines Röhrensystems steigern sie die Wasserinfiltrationsrate und vermindern damit die Bodenerosion.
- Die im Darmtrakt der Regenwürmer gebildeten organo-mineralischen Verbindungen (Ton-Humus-Komplexe) erhöhen die Stabilität im Boden.

Die intensive Beteiligung an den Nährstoffkreisläufen exponiert sie für alle im Ökosystem befindlichen Stoffe. Das hat beim Vorhandensein toxischer Substanzen ein großes Gefährdungspotenzial für die darauf aufbauenden Nahrungsketten zur Folge. Deshalb werden Regenwürmer häufig als Akkumulationsindikatoren im Freiland und Labor untersucht und in Überwachungsprogrammen eingesetzt (Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN 2008, Calisi *et al.* 2013, Leveque *et al.* 2013, Rieder *et al.* 2013, Alvarez *et al.* 2014, Andrade *et al.* 2014).

Für die Zwecke der UPB eignen sich die tiefgrabenden Arten, die sich insbesondere von toter organischer Substanz ernähren und diese beim Graben ihrer Röhren mit Mineralboden vermischen. Dadurch stellen sie einen Zusammenhang zwi-

schen der organischen Bodenaufgabe und den darunter liegenden Bodenhorizonten her und zeigen die Belastung des gesamten Umweltmediums Boden auf. Die beiden Arten *Lumbricus terrestris* und *Aporrectodea longa* wurden aus folgenden Gründen als geeignete Probenarten für die UPB ausgewählt:

- Sie sind in Deutschland die am weitesten verbreiteten tiefgrabenden Arten.
- Es sind die einzigen Vertreter der Destruenten in terrestrischen Ökosystemen, die aufgrund ihres Körpergewichtes und ihrer Häufigkeit in ausreichender Biomasse verfügbar sind.
- Als wichtige Bodenbildner nehmen sie im Energiefluss und Stoffumsatz der Ökosysteme eine zentrale Stellung ein.
- Sie nehmen als Nahrungsgrundlage für sehr viele Prädatoren eine exponierte Stellung in den terrestrischen Nahrungsnetzen ein.
- Sie sind sehr standorttreu.

Die beiden Regenwurmarten repräsentieren für die UPB die trophische Ebene der Destruenten in terrestrischen Ökosystemen.

## 4 Zielkompartimente

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Metalle und organische Schadstoffe sowohl in den einzelnen Organen des Wurmkörpers als auch innerhalb der Organe unterschiedlich akkumulieren (Morgan und Morgan 1990, Bengtsson und Rundgren 1992, Sforzini *et al.* 2015). Zudem lässt sich die Sektion bestimmter Wurmteile nur schwer standardisieren, weil damit der Verlust von Blut und Coelomflüssigkeit verbunden ist und Kontaminationsgefahr besteht. Dies spricht für die Gewinnung von Ganzkörperproben.

Die Menge der aufgenommenen Nahrung der Regenwürmer ist u.a. abhängig von ihrer Qualität (Hendriksen 1991) sowie der Bodenfeuchte und –temperatur (Curry und Schmidt 2007). Zudem korreliert die Menge des Darminhalts positiv mit dem Wurmgewicht (Curry und Bolger 1984, Taylor und Taylor 2014). Somit unterliegt der Darminhalt in seiner Quantität sowie in seiner qualitativen Zusammensetzung individuellen, zeitlichen und

räumlichen Schwankungen, wodurch eine Vergleichbarkeit der Proben nicht gegeben ist. Daher besteht die Notwendigkeit, den Darminhalt vom Wurmkörper zu trennen.

Der Kot kann als biologisch standardisierter Bodenextrakt auf Stoffe untersucht werden, die im Wurm selbst nicht oder schlecht nachweisbar sind. Hierzu zählen beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Paulus *et al.* 1994, Klein und Paulus 1995).

In der UPB werden daher der Gesamtkörper ohne Darminhalt und der Regenwurmkot als getrennte Zielkompartimente gewonnen.

## 5 Festlegungen für die Probenahme

### 5.1 Artbestimmung

Zur sicheren Bestimmung der beiden Arten *Lumbricus terrestris* und *Aporrectodea longa* im Gelände bedarf es praktischer Erfahrung. Die makroskopischen Bestimmungsmerkmale beider Zielarten sind in Tab. 1 dargestellt.

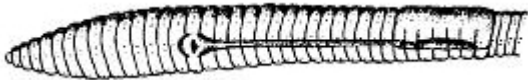

### 5.2 Auswahl und Abgrenzung der Probenahmeflächen, Auswahl der Probenart

Zur Festlegung der Probenahmefläche sowie der Probenart muss vor der ersten Probenahme ein Screening durchgeführt werden. Ziel ist, die Verfügbarkeit der beiden Probenarten, die Streubreite der Schadstoffgehalte sowie das räumliche Muster der Schadstoffbelastung zu untersuchen.

Bei einem Screening ist wie folgt vorzugehen:

- Alle potenziell für die beiden Regenwurmarten geeigneten Teilflächen mit ausreichender Mindestgröße und langfristiger Nutzungskonstanz werden kartiert.
- Sind auf den kartierten Teilflächen eine der beiden Arten oder beide Arten verfügbar, werden die Teilflächen zu Screeningflächen, von denen zumindest eine der beiden Arten als Probe in ausreichender Quantität gewonnen werden kann.

**Tab. 1: Wichtige makroskopische Merkmale der beiden Zielarten**

<i>Lumbricus terrestris</i>		<i>Aporrectodea longa</i>
		
dunkelbraun-violett, unterseits heller als oberseits	<b>Farbe</b>	rauchgrau, stark irisierend, unterseits ± gleich
90 – 300 mm	<b>Länge</b>	120 – 160 mm
6 – 9 mm	<b>Durchmesser</b>	6 – 8 mm
groß, die stark erhabenen Drüsenhöfe gehen auf das 14. und 16. Segment über	<b>männliche Poren</b>	groß, auf das 15. Segment beschränkt
31. oder 32. – 37. Segment, rötlich gefärbt	<b>Clitellum</b>	32. – 34. Segment, schokoladenbraun
33. – 36. Segment	<b>Pubertätswälle</b>	32. – 34. Segment
Borsten des 25., 26. und 27. Segmentes auf Drüsenpapillen und zu Furchenborsten umgewandelt	<b>ventrale Borsten</b>	Borsten des 9., 10. und 11. Segmentes auf Drüsenpapillen

- Die Regenwürmer ohne Darminhalt und der Regenwurmkot werden getrennt nach Probenarten und Screeningflächen homogenisiert und analysiert.

Für die Festlegung der Probenart ist die Verfügbarkeit das wichtigste Entscheidungskriterium. *L. terrestris* ist gegenüber *A. longa* als Probenart zu bevorzugen, da er in den meisten UPB-Probenahmegebieten häufiger vorkommt. Zudem ist *L. terrestris* bezüglich seines Akkumulationsverhaltens besser untersucht (u.a. Slizovskiy und Kelsey 2010, Lapiet *et al.* 2011, Slizovskiy *et al.* 2011) als *A. longa* (u.a. Johnson *et al.* 2002, Tischer 2009, Qui *et al.* 2014).

Die Probenahmefläche wird durch die Auswahl von geeigneten Entnahmestellen festgelegt. Sie ist die Summe der ausgewählten Entnahmestellen. Geeignete Entnahmestellen sind Screeningflächen, auf denen die Verfügbarkeit der angestrebten Probenart und die Repräsentativität der räumlichen Belastung gegeben sind.

### 5.3 Auswahl der Individuen und Stichprobengröße

Für die UPB wird die (Alters)Gruppe der geschlechtsreifen Individuen gewonnen. Diese ist an der Ausbildung des Clitellums zu erkennen und kann sicher im Gelände anhand äußerer, mit bloßem Auge gut identifizierbarer Merkmale bestimmt werden (Tab. 1).

Pro Entnahmestelle können mehrere schmale Fangstreifen ausgewählt werden, zum Beispiel ca. 5 m breit und 30 m lang (Abb. 1). Die pro Entnahmestelle zu sammelnde Regenwurmmasse wird im gebietsbezogenen Probenahmeplan festgelegt.

Um die für die UPB erforderliche Probenmenge von 1.100 g Regenwurmkörper ohne Darminhalt pro Probenahmefläche zu erreichen, müssen etwa 1.400 g Regenwürmer gesammelt werden.

### 5.4 Probenahmezeitraum und -häufigkeit

Die Regenwurmprobenahme wird von Oktober bis Mitte Dezember durchgeführt. In diesem Zeitraum besteht die größte Wahrscheinlichkeit, einen hohen Anteil an geschlechtsreifen Individuen zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus befinden sich die Würmer im ökologisch-physiologisch stabilsten (Aktivitäts-)Zeitraum.

Nach regenarmen Sommern und demzufolge trockenen Böden befinden sich die Regenwürmer im Frühherbst noch im Ruhestadium. Sie können dann auch nicht mittels Strom an die Bodenoberfläche getrieben werden. Die Probenahme kann in diesem Fall erst nach Regenfällen durchgeführt werden.

## 5.5 Gebietsbezogener Probenahmeplan

Auf Grundlage der Probenahmerichtlinie müssen für die einzelnen Probenahmegebiete bzw. -flächen spezifische Festlegungen getroffen werden, die in einem gebietsbezogenen Probenahmeplan dokumentiert sind. Dies betrifft u.a.:

- Lage und Abgrenzung der Probenahmeflächen,
- erforderlicher Stichprobenumfang,
- Probenahmezeitraum,
- zuständige Genehmigungsbehörden,
- Flächeninhaber.

Hierbei ist zu berücksichtigen, wie eine langfristige Kontinuität der Probenahme gewährleistet werden kann. Bei Änderungen muss das Dokument aktualisiert werden.

## 6 Durchführung der Probenahme

Alle bei der Probenahme und biometrischen Probenbeschreibung erhobenen Daten sind in den entsprechenden Probendatenblättern (siehe Anhang) zu dokumentieren. Zu jeder Probenahme ist zudem ein Protokoll mit folgendem Inhalt anzufertigen:

- an der Probenahme beteiligte Personen,
- chronologischer Ablauf der Probenahme,
- die für die Probenahme zugrundeliegende Version der Probenahmerichtlinie und des gebietsbezogenen Probenahmeplans sowie
- Abweichungen von der Probenahmerichtlinie und dem gebietsbezogenen Probenahmeplan.

### 6.1 Technische Vorbereitungen

Der Fang der Regenwürmer erfolgt mit Wechselstrom. Dies erfordert besondere Sicherheitsvorkehrungen, die in der "Sicherheitsrichtlinie für den Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom für die Umweltprobenbank" dargelegt sind (siehe Anhang). Jede an der Probenahme beteiligte Person ist vom Leiter der Probenahme:

- über die Gefahren beim Fangen von Regenwürmern mit elektrischem Strom zu unterrichten,

- in die Handhabung der zu verwendenden Elektroregenschwammfanganlage einzuweisen und
- mit der "Sicherheitsrichtlinie für den Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom für die Umweltprobenbank" vertraut zu machen.

### 6.2 Erforderliche Ausrüstung und Reinigungsvorschriften

#### Für die Geländearbeit

- Generator (Aggregat) (230 V) mit 4-Takt-Ottomotor,
- Ampèremeter, Notausschalter und Schutzsicherung,
- Elektroden mit Verbindungskabel,
- Verlängerungskabel (mindestens 50 m),
- Verbindungskabel von Elektrodenreihen zum Ampèremeter (ca. 2 x 50 m),
- tragbares Voltmeter inkl. zwei Stichlingen zum Messen der Schrittspannung,
- Absperrband mit Stangen und Warnschilder für öffentlich zugängliche Flächen,
- mobiler Weidezaun für besetzte Weiden,
- elektrischer Rasenmäher, Sense oder elektrischer Rasentrimmer inklusive Rechen,
- Gummistiefel und Gummihandschuhe mit Isoliereigenschaften bis 1.000 Volt geprüft,
- isolierte Edelstahlpinzetten,
- Hälterungsvorrichtungen zur Darmentleerung inklusive Petrischalen aus Borosilikat mit Deckel (Abb. 2),
- Sammelgefäße aus Borosilikat oder Edelstahl,
- Probendatenblätter,
- Waage (Wägebereich mindestens 4 kg, Ableseung auf 1 g),
- Papiertücher und wasserfester Edding,
- puderfreie Laborhandschuhe,
- Luft- und Bodenthermometer.

#### Für die Laborarbeit

- Reinluftarbeitsplatz mit Partikel- und Aktivkohlefilterung,
- Probendatenblätter,
- Edelstahlpinzetten,
- Laborhandschuhe,
- Kühlvorrichtung für den Vorgang der Darmentleerung (8°– 12°C),

- Tiefkühltruhe (mindestens -20°C) zum Abtöten der Würmer,
- Cryobehälter zum raschen Tiefkühlen und Lagern der Proben in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (LIN),
- Flüssigstickstoff,
- Schutzbekleidung zum Umgang mit flüssigem Stickstoff,
- Edelstahlgefäße (1,5 l und 5,5 l) mit Deckel und Klammern.

Die Reinigung der Probengefäße und -geräte erfolgt in einer Laborspülmaschine mit chlorfreiem Intensivreiniger im ersten Reinigungsgang. Nach Kalt- und Heißspülung (90 – 95°C) erfolgt eine Neutralisation mit 30%iger Phosphorsäure in warmem Wasser. Anschließend erfolgen Heiß- und Kaltspülgänge mit deionisiertem Wasser. Nach dem Spülen werden die Gefäße bei 130°C (+/- 10°C) im Trockenschrank mindestens eine Stunde nachbehandelt (zur Sterilisation). Anschließend kühlen die Gefäße im geschlossenen Trockenschrank ab. Bei Kunststoffen entfällt die Sterilisation.

### 6.3 Probenahmetechnik

Nach dem Schema in Abb. 1 werden der Generator, der Kontrollkasten mit Ampèremeter und Not-ausschalter sowie die Elektrodenreihen auf dem Fangstreifen angeordnet. Das Stromaggregat wird so platziert, dass keine Kontamination der Fangstreifen und der Proben durch Abgase erfolgen kann. Die Windrichtung muss deshalb regelmäßig kontrolliert werden, um gegebenenfalls die Platzierung des Gerätes zu ändern. Die beigefügte Sicherheitsrichtlinie ist zu beachten.

Die beiden Elektrodenreihen werden zickzackförmig gesteckt, wodurch sich die Fangfläche pro Reihe gegenüber einer geradlinigen Anordnung der Elektroden erhöht. Der Abstand der Reihen richtet sich nach den örtlichen Gegebenheiten.

Nach Einschalten des Generators wird die Schrittspannung gemessen und die Stromstärke an dem eingebauten Ampèremeter abgelesen. Die Messung der Schrittspannung mittels eines Spannungsmessers erfolgt an zwei Stichlingen, die direkt an den Elektrodenreihen im Abstand von einer Schrittlänge in den Boden gesteckt werden. Exakte

Angaben zu einer geeigneten Spannung können nicht gemacht werden, da je nach Leitfähigkeit des Bodens auch bei niedrigen Werten gute Fangfolge möglich sind.

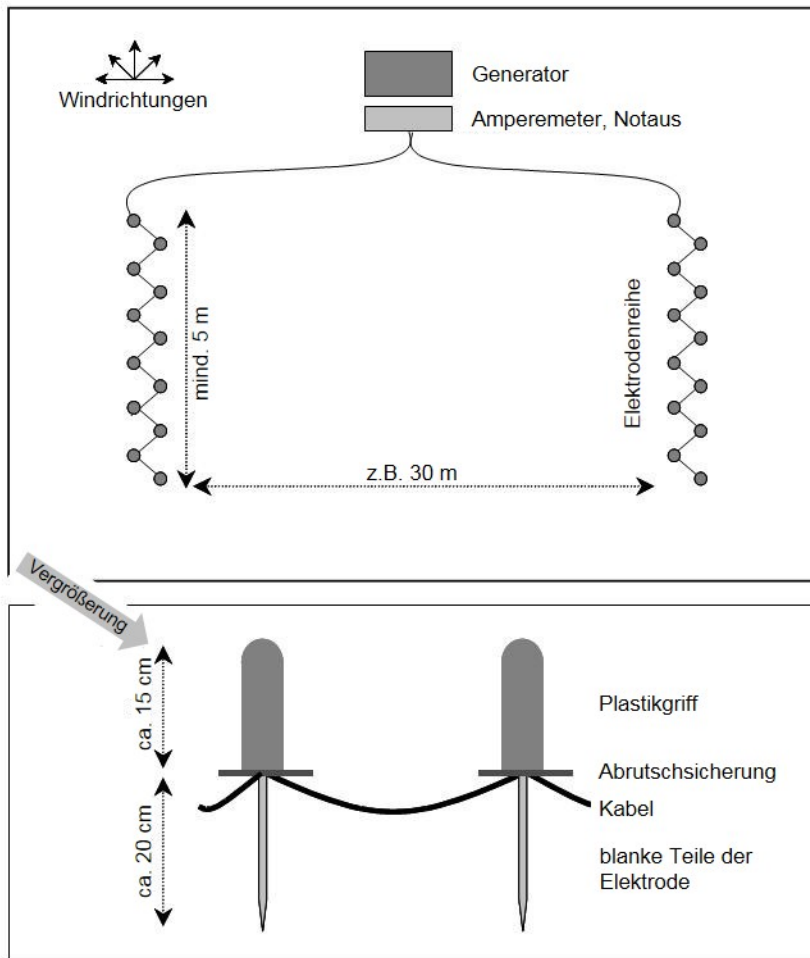
Beide Elektrodenreihen werden durch Umstecken der Elektroden entweder in einer Richtung oder aufeinander zu über die Fläche bewegt.

Da die Probenahme mit Wechselstrom durchgeführt wird, erscheinen die Regenwürmer an beiden Elektrodenreihen im Umfeld von etwa 30 – 50 cm an der Bodenoberfläche. Das Absammeln geschieht stets an beiden Elektrodenreihen (Abb. 1).

Das Umstecken birgt für den Probennehmer die Gefahr, Spannung an den blanken Stellen der Elektroden abzugreifen. Deshalb darf immer nur eine Elektrode angefasst und umgesteckt werden (vgl. Sicherheitsrichtlinie). Die Umsteckhäufigkeit und -geschwindigkeit richtet sich nach der Zeitspanne, innerhalb derer die Individuen an der Bodenoberfläche erscheinen.

Die an den Elektroden erscheinenden Individuen der Zielart, die ein Clitellum ausgebildet haben, werden mit isolierten Edelstahlpinzetten vom Boden aufgesammelt. Die Würmer dürfen erst nach dem vollständigen Verlassen ihrer Röhren mit der Pinzette gegriffen werden, da sie ansonsten verletzt werden können. Verletzte Individuen werden nicht gesammelt. Die Würmer werden von anhaftenden Bodenpartikeln oder Grasresten durch Abstreifen mit einer Pinzette gesäubert und in einem ausreichend hohen Gefäß aus Borosilikat oder Edelstahl gesammelt. Etwa 10 Individuen werden in vorher beschriftete Petrischalen (ca. 9 cm Durchmesser) umgesetzt und gewogen. Diese Zahl garantiert, dass die Würmer während der fünf-tägigen Hälterung in den Schalen nicht austrocknen.

Die Anzahl der Regenwürmer pro Schale und deren Gewicht wird in den Datenblättern notiert. Die Petrischale wird in die Hälterungsvorrichtung zur Darmentleerung gestellt (Abb. 2). Ist diese mit allen Petrischalen gefüllt, wird sie so verschlossen, dass die Würmer die Deckel der Schalen nicht aufdrücken können.



**Abb. 1: Beispiel einer Fangvorrichtung**

Alle gefangenen Individuen verbleiben 5 Tage in der Hälterungsvorrichtung zur Darmentleerung im (dunklen) Kühlschrank bei 8 – 12°C. Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen haben ergeben, dass diese Temperaturspanne die besten Ergebnisse bezüglich der Darmentleerung liefert, ohne dass (bei genügend hoher Individuenzahl pro Petrischale) die Gefahr des Austrocknens der Würmer besteht, und ohne dass eine Remobilisierung der im Wurmkörper gebundenen Schadstoffe stattfindet (Klein und Paulus 1995).

Nach dem ersten Hälterungstag wird der Kot unter Reinluftbedingungen mit einer Edelstahlpinzette aus jeder Petrischale in ein Edelstahlgefäß gesammelt. Der Kot aus allen Petrischalen wird gewogen und über flüssigem Stickstoff gelagert. Geschädigte oder abgestorbene Regenwürmer werden entfernt und deren Anzahl notiert.

Nach fünf Tagen der Hälterung wird das Absammeln und Wiegen des Kotes wiederholt. Geschädigte oder abgestorbene Regenwürmer werden entnommen und deren Anzahl notiert. Nach dem Absammeln des Kotes werden die Regenwürmer in der Hälterungsvorrichtung zur Darmentleerung in eine Tiefkühltruhe bei mindestens -20°C überführt. Dadurch geben sie weiteren Kot ab und werden gleichzeitig abgetötet. Nach ca. 1 bis 2 Tagen sind die Regenwürmer durchgefroren. Die Dauer ist unter anderem abhängig von der Gesamtbiomasse, der Anzahl der Petrischalen und Hälterungsvorrichtungen in der Tiefkühltruhe.

Die durchgefrorenen Regenwürmer werden schnellstmöglich über Flüssigstickstoff eingelagert. Dazu werden sie in tiefgefrorenem Zustand unter Reinluftbedingungen aus den Petrischalen genommen, mit Edelstahlpinzetten vom Kot getrennt und

in mit Flüssigstickstoff vorgekühlte Edelstahlgefäße umgesetzt.

Anschließend wird das Gesamtgewicht der Regenwürmer ohne Darminhalt ermittelt und die Gefäße werden in die Gasphase über flüssigem Stickstoff

gebracht. Der in der Tiefkühltruhe abgegebene Kot wird verworfen, da er sehr schnell auftaut. Alle erhobenen Daten werden in die entsprechenden Probandatenblätter eingetragen.

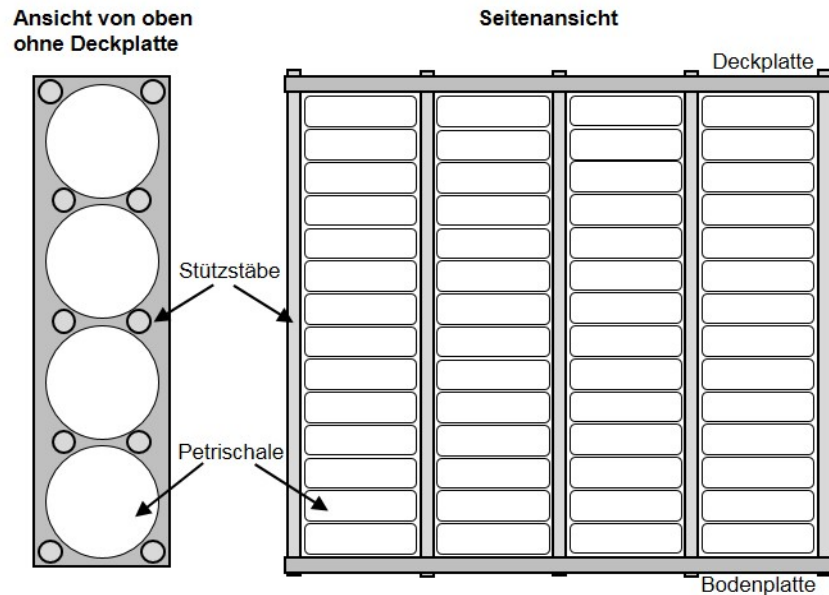


Abb. 2: Hälterungsvorrichtung zur Darmentleerung

## 7 Biometrische Probencharakterisierung

Zur Beschreibung der gesammelten Regenwurmproben werden bei der Probenaufarbeitung folgende Parameter bestimmt (vgl. Kap. 6.3):

- Gesamtgewicht der Würmer ohne Darminhalt (Ablesung auf 1 g),
- Gesamtgewicht des abgegebenen Kotes (Ablesung auf 1 g),
- Anzahl der in der Probe enthaltenen Individuen ohne Darminhalt.

Daraus lassen sich die durchschnittlichen Wurmgewichte pro Individuum und die pro Individuum durchschnittlich abgegebene Kotmenge errechnen.

## 8 Literatur

- Alvarez C.R., Moreno M.J., Bernardo F.J.G., Martín-Doimeadios R.C.R. und Nevado B.J.J. (2014): Mercury methylation, uptake and bioaccumulation by the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Applied Soil Ecology*, 84, 45-53
- Andrade N.A., Centofanti T., McConnell L.L., Hapeman C.J., Torrents A., Nguyen A., Beyer W.N., Chaney R.L., Novak J.M., Anderson M.O. und Cantrell K.B. (2014): Utilizing thin-film solid-phase extraction to assess the effect of organic carbon amendments on the bioavailability of DDT and dieldrin to earthworms. *Environmental Pollution*, 185, 307-313
- Bengtsson G. und Rundgren S. (1992): Seasonal variation of lead uptake in the earthworm *Lumbricus terrestris* and the influence of soil liming and acidification. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23, 198-205
- Calisi A., Zaccarelli N., Lionetto M.G. und Schettino T. (2013): Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: Application to the monitoring of soil heavy metal pollution. *Chemosphere*, 90(11), 2637-2644



- Curry J.P. und Bolger T. (1984): Growth, reproduction and litter and soil consumption by *Lumbricus terrestris* L. in reclaimed peat. *Soil Biology & Biochemistry*, 16(3), 253-257
- Curry J.P. und Schmidt O. (2007): The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, 50, 463-477
- Hendriksen N.B. (1991): Gut load and food-retention time in the earthworms *Lumbricus festivus* and *L. castaneus*: A field study. *Biology and Fertility of Soils*, 11, 170-173
- Johnson D.L., Jones K.C., Langdon C.J., Pearce T.G. und Semple K.T. (2002): Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1363-1370
- Klein R. und Paulus M. (1995): Terrestrische Probenarten - Regenwürmer. In: Klein R. und Paulus M. (Hrsg.): *Umweltproben für die Schadstoffanalytik im Biomonitoring - Standards zur Qualitätssicherung bis zum Laboreingang*, S. 183-202. Jena, Gustav Fischer Verlag
- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN (2008): Biologische Verfahren zur Erfassung der Wirkung von Luftverunreinigungen (Bioindikation) - Passives Biomonitoring mit Regenwürmern als Akkumulationsindikatoren. In: Verein Deutscher Ingenieure (Hrsg.): *VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a: Maximale Immissions-Werte*, VDI 4230, Blatt 2, S., Düsseldorf
- Lapied E., Nahmani J.Y., Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrayat J.-M., Oughton D.H. und Joner E.J. (2011): Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International*, 37(6), 1105-1110
- Leveque T., Capowiez Y., Schreck E., Mazzia C., Auffan M., Foucault Y., Austruy A. und Dumat C. (2013): Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environmental Pollution*, 179, 232-241
- Morgan J.E. und Morgan A.J. (1990): The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* samples from one uncontaminated and four polluted soils. *Oecologia*, 84, 559-566
- Paulus M., Altmeyer M., Klein R., Hildebrand A., Ostapczuk P. und Oxyinos K. (1994): Biomonitoring und Umweltprobenbank - II. Aufbau flächenrepräsentativer Probenahmen von Umweltproben zur Schadstoffanalytik am Beispiel der Regenwürmer in landwirtschaftlich genutzten Räumen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 6(6), 375-383
- Quack M., Bartel M., Klein R., Neitzke M., Nentwich K., Paulus M. und Wagner G. (2003): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung - Regenwurm (*Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea longa*). [www.umweltprobenbank.de](http://www.umweltprobenbank.de)
- Qiu H., Peijnenburg W.J.G.M., van Gestel C.A.M. und Vijver M.G. (2014): Can commonly measurable traits explain differences in metal accumulation and toxicity in earthworm species? *Ecotoxicology*, 23(1), 21-32
- Rieder S.R., Brunner I., Daniel O., Liu B. und Frey B. (2013): Methylation of mercury in earthworms and the effect of mercury on the associated bacterial communities. *Plos One*, 8(4), e1215
- Sforzini S., Moore M.N., Boeri M., Benfenati E., Colombo A. und Viarengo A. (2014): Immunofluorescence detection and localization of B[a]P and TCDD in earthworm tissues. *Chemosphere*, 107, 282-289
- Slizovskiy I.B. und Kelsey J.W. (2010): Soil sterilization affects aging-related sequestration and bioavailability of p,p'-DDE and anthracene to earthworms. *Environmental Pollution*, 158(10), 3285-3289
- Slizovskiy I.B., Kelsey J.W. und Hatzinger P.B. (2011): Surfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soil efficacy and toxicological consequences to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 112-123
- Taylor A.R. und Taylor A.F.S. (2014): Assessing daily egestion rates in earthworms: using fungal spores as a natural soil marker to estimate gut transit time. *Biology and Fertility of Soils*, 50(1), 179-183
- Tischer S. (2009): Earthworms (Lumbricidae) as bioindicators: the relationship between in-soil and in-tissue heavy metal content. *Polish Journal of Ecology*, 57(3), 513-523
- Umweltbundesamt (Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); [www.umweltprobenbank.de](http://www.umweltprobenbank.de)
- Umweltbundesamt (Hrsg.) (2014): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2014); [www.umweltprobenbank.de](http://www.umweltprobenbank.de)

## Checkliste zur Vorbereitung und Durchführung der Probenahme

<b>Probenart:</b>	<b>Regenwurm (<i>Lumbricus terrestris</i> / <i>Aporrectodea longa</i>)</b>
Zielkompartimente:	Regenwürmer ohne Darminhalt, Regenwurmkot
Probenindividuen:	adulte Regenwürmer
Stichprobenumfang:	mindestens 50 Individuen pro Entnahmestelle
Probenmenge für die UPB:	für eine Probenmenge von 1.100 g wird die Entnahme von ca. 1.400 g je Probenahmeffläche empfohlen
Probenahmezeitraum:	Oktober bis Mitte Dezember
Probenahmehäufigkeit:	eine Probenahme pro Jahr
Erforderliche Ausrüstung für die Geländearbeit:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probendatenblätter</li> <li>• Fangvorrichtung und Zubehör</li> <li>• Sicherheitsstiefel und -handschuhe</li> <li>• isolierte Edelstahlpinzetten zum Absammeln der Würmer</li> <li>• Sammelgefäße aus Borosilikat oder Edelstahl</li> <li>• wasserfester Edding zur Beschriftung der Petrischalen und der Edelstahlgefäße</li> <li>• Waage (Ablesung 1 g) und Prüfgewichte</li> <li>• Hälterungsvorrichtungen zur Darmentleerung inkl. Petrischalen</li> <li>• Luftthermometer, Bodenthermometer</li> <li>• Transportfahrzeug inkl. Reinluftarbeitsplatz mit Aktivkohle- und Partikelfilterung</li> </ul>
Probenverpackung bis zur -aufarbeitung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edelstahlgefäße (1,5 l und 5,5 l)</li> <li>• Aufbewahrung der Regenwürmer bis zur vollständigen Darmentleerung in den Petrischalen der Hälterungsvorrichtungen</li> </ul>
Probentransport und -zwischenlagerung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kühlgerät zur Zwischenlagerung der in der Hälterungsvorrichtung befindlichen Regenwürmer (bei 8 – 12°C)</li> <li>• Kühlgerät zum Abtöten der Würmer (mindestens -20°C)</li> <li>• Cryobehälter zum raschen Tiefkühlen und Lagern der Proben in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (LIN)</li> </ul>
Erforderliche Ausrüstung für die Laborarbeit:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probendatenblätter</li> <li>• Edelstahlpinzetten</li> <li>• Laborhandschuhe und Laborbekleidung</li> <li>• Waage (Ablesung 1 g)</li> <li>• Reinluftarbeitsplatz mit Aktivkohle- und Partikelfilterung</li> <li>• Schutzbekleidung zum Umgang mit flüssigem Stickstoff</li> </ul>
Biometrische Probencharakterisierung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gesamtgewicht der Würmer ohne Darminhalt (Ablesung auf 1 g)</li> <li>• Gesamtgewicht des abgegebenen Kotes (Ablesung auf 1 g)</li> <li>• Anzahl der Wurmindividuen ohne Darminhalt</li> </ul>

# **Sicherheitsrichtlinie für den Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom für die Umweltprobenbank**

als Anlage zur Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung "Regenwurm", Stand August 2018

## **Grundlagen**

Der Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom für die UPB erfolgt ausschließlich mit einer von einer elektrotechnischen Fachkraft geprüften und mit einer Prüfplakette versehenen Anlage. Die Anlage muss einmal jährlich auf Sicherheit und Funktionsfähigkeit geprüft werden. Ist die Anlage mängelfrei, erhält sie eine Prüfplakette mit einer Gültigkeit von einem Jahr.

Es dürfen nur Fanganlagen mit gültiger Prüfplakette eingesetzt werden.

Die jeweils aktuelle Fassung der Richtlinie zur Probenahme von Regenwürmern der UPB beschreibt die exakte Vorgehensweise beim Fang von Regenwürmern mit elektrischem Strom.

## **Einsatz von Arbeitskräften**

Vor Beginn des Betriebes der Elektroregenwurmfanganlage müssen die an der Probenahme beteiligten Personen vom verantwortlichen Probenahmeleiter geschult werden.

Beim Betrieb der Elektroregenwurmfanganlage müssen immer mindestens 2 Personen anwesend sein, die in Erster Hilfe ausgebildet sind. Die letzte Ersthelferschulung darf nicht länger als zwei Jahre zurückliegen. Der verantwortliche Leiter der Probenahme und mindestens ein Helfer müssen mit den unten beschriebenen Rettungsmaßnahmen vertraut sein.

Die Elektroregenwurmfanganlage darf nur von dem verantwortlichen Leiter der Probenahme gemeinsam mit mindestens einem unterwiesenen Helfer betrieben werden. Es ist dafür Sorge zu tragen, dass eventuelle Gefahren für Dritte rechtzeitig erkannt werden. Bei Gefahr ist die Anlage unverzüglich abzuschalten.

Beim Betreiben der Elektroregenwurmfanganlage müssen unbefugte Personen in geeigneter Weise vor Gefahren gewarnt und ggfs. aus dem Gefahrenbereich verwiesen werden.

## **Bedienen der Elektroregenwurmfanganlage**

Alle an der Probenahme beteiligten Personen müssen während des Betriebes der Elektroregenwurmfanganlage Handschuhe und Gummistiefel benutzen, die hinsichtlich ihrer elektrischen Isoliereigenschaft bis 1.000 Volt geprüft sind. Die Griffleisten der Edelstahlpinzetten zum Ergreifen der Regenwürmer müssen mit Isolierband oder Schrumpfschlauch isoliert sein.

Die isolierende Schutzkleidung muss vor jedem Gebrauch von dem Benutzer auf offensichtliche Schäden untersucht werden. Nach dem Gebrauch ist die isolierende Schutzkleidung zu säubern und zu trocknen.

Bewegliche Leitungen sind schonend zu behandeln und vor Beschädigungen durch Kanten, schwere Belastung und dergleichen zu schützen.

Die Anschlussvorrichtungen – auch Steckvorrichtungen – für die Elektrodenleitungen müssen beim Herstellen oder Lösen des Anschlusses spannungsfrei sein. Bevor die Elektroregenwurmfanganlage in Betrieb gesetzt wird, muss der Schutz gegen direktes und indirektes Berühren von spannungsführenden Teilen sichergestellt sein. Vor jeder Inbetriebnahme ist die Elektroregenwurmfanganlage, insbesondere

deren Zuleitung, gründlich auf äußere Beschädigungen zu untersuchen. Geräte und Anlagenteile, die gefahrbringend beschädigt sind, dürfen nicht betrieben werden.

Der Gefahrenbereich ist festzulegen und abzusperren sowie durch Warnschilder in geeigneter Weise kenntlich zu machen. Der Schalter zum Abschalten der Elektrodenzuleitungen der Elektroregenvormfanganlage darf erst auf Anordnung des verantwortlichen Probenahmeleiters eingeschaltet werden. Nach der Inbetriebnahme der Elektroregenvormfanganlage sollte sofort die Schrittspannung in der Nähe der Elektrodenreihen gemessen und regelmäßig überprüft werden. Beträgt die Spannung mehr als 50 Volt, sind die Elektrodenreihen weiter auseinander zu bringen, bis die 50 Volt unterschritten werden. Bringt dies nicht den gewünschten Erfolg, sollte die Anlage abgebaut und ggfs. an anderer Stelle erneut aufgebaut werden.

Die Elektroden dürfen nur an dem isolierten Griff angefasst werden. Auch beim Tragen der Schutzkleidung ist ein Anfassen des blanken Endes unzulässig. Eine an der Probenahme beteiligte Person darf immer nur eine Elektrode in die Hand nehmen.

Treten Gefahren oder Unregelmäßigkeiten auf, muss die Elektroregenvormfanganlage sofort abgeschaltet werden.

Darüber hinaus sollte die Elektroregenvormfanganlage bei Niederschlägen, insbesondere Regen und Schneefall, nicht betrieben werden.

### **Maßnahmen bei Unfällen**

Generell ist das Schema der Rettungskette der Ersten Hilfe auch hier zu beachten und bei Hilfeleistungen unbedingt auf Eigenschutz zu achten. Hierbei ist unter anderem wichtig:

- Zur Rettung des Verletzten zuerst Spannungsfreiheit der Anlage sicherstellen. Anlagen und Geräte müssen mit dem Not-Aus-Taster oder der Sicherung von der Stromversorgung getrennt und die Generatoren abgestellt werden. Das bloße Abschalten des Gerätes oder der Leitung stellt die Spannungsfreiheit nicht sicher.
- Bei bewusstlosen Personen ist nach dem Abschalten der Stromversorgung die Sicherstellung von Atmung und Herz-Kreislauffunktion vorrangig. Gegebenenfalls ist die sofortige Herz-Lungen-Wiederbelebung einzuleiten. Bei Regenwurm-Probenahmen wird aus Gründen der Arbeitssicherheit immer ein Defibrillator mitgeführt. Dieser ist entsprechend der Sprachanweisungen zu bedienen. Über 112 wird ein Notruf abgesetzt.
- Hat eine Person einen Stromschlag erlitten, muss diese auch bei völligem Wohlbefinden umgehend einen Arzt aufsuchen, um eine Herzschädigung auszuschließen. Die Person muss beaufsichtigt werden, bis sie sich in ärztlicher Obhut befindet.

**UMWELTPROBENBANK DES BUNDES**

**Probendatenblatt 1: Entnahmestelle(n)**

**Regenwurm (*Lumbricus terrestris* / *Aporrectodea longa*)**

**Identifikation:**

___	___	___	___	___	___	___	Probenart
							Probenzustand
							Entnahmedatum (MM/JJ)
							Probenahmegebiet (PNG)
							Gebietsausschnitt (GA)
							Probenahmefläche (PNF)
							Zusatzangabe

**Probenahmefläche** (Klartext)

**Entnahmestelle** (Nummer) \_\_\_\_\_

**Entnahmestelle** (Klartext) \_\_\_\_\_

**Probenahmeleiter**

**Anmerkungen** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Notizen** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**UMWELTPROBENBANK DES BUNDES**

**Probendatenblatt 2: Witterung  
Regenwurm (*Lumbricus terrestris* / *Aporrectodea longa*)**









**Identifikation:**    \_\_\_ / X / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Entnahmestelle:** \_\_\_\_\_

Datum des letzten Niederschlags vor der Probenahme: \_\_\_ . \_\_\_ . \_\_\_

Art des Niederschlags: \_\_\_

Beginn der Probenahme		Ende der Probenahme
___ . ___ . ___	Datum der Probenahme	___ . ___ . ___
___ : ___	Uhrzeit	___ : ___
___	Lufttemperatur in 1,5 m Höhe (°C)	___
___	Bodentemperatur in 10 cm Tiefe (°C)	___
___ / 8	Wolkenbedeckung	___ / 8
___	Wolkenart (siehe unten)	___
___	Windrichtung	___
___	Windstärke in Beaufort (siehe Tab. unten)	___
___	Art des Niederschlags (siehe Tab. unten)	___

<p><b>Wolkenart:</b></p> <p>0 = unbewölkt 1 = Cirren 2 = Stratus 3 = Cumulus 4 = Nebel 5 = Hochnebel 6 = Stratocumulus</p>	 <b>Cirren</b>	 <b>Stratus</b>	 <b>Cumulus</b>	 <b>Stratocumulus</b>
	   			

<p><b>Art des Niederschlags:</b></p> <p>0 = kein Niederschlag 1 = Regen 2 = Nieselregen 3 = Schnee 4 = Tau 5 = Reif 6 = Starkregen 7 = Hagel</p>	<p><b>Windstärke (nach Beaufort):</b></p> <p>0 = Windstille (Flaute) 1 = sehr leichte Brise 2 = leichte Brise, bewegt Blätter 3 = schwache Brise, bewegt Zweige 4 = mäßige Brise, bewegt dünne Äste 5 = frische Brise, bewegt mittlere Äste 6 = starker Wind, bewegt dicke Äste 7 = steifer Wind, schüttelt Bäume</p>
--	---



## UMWELTPROBENBANK DES BUNDES

### Probendatenblatt 4: Probenahmetechnik und Lagerung Regenwurm (*Lumbricus terrestris* / *Aporrectodea longa*)

Identifikation:     \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ / X / \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_

Entnahmestelle: \_\_\_\_\_

**Fangtag 1:**           Schalen Nr. von \_\_\_ \_\_\_ bis \_\_\_ \_\_\_

	Beginn des Fanges	Ende des Fanges = Beginn der Darmentleerung	Ende der Darmentleerung
Datum			
Uhrzeit			

**Fangtag 2:**           Schalen Nr. von \_\_\_ \_\_\_ bis \_\_\_ \_\_\_

	Beginn des Fanges	Ende des Fanges = Beginn der Darmentleerung	Ende der Darmentleerung
Datum			
Uhrzeit			

**Probenahme:**     Gesamte Fangstreifenfläche einer Entnahmestelle     \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ m<sup>2</sup>  
                           Anzahl der Fangstreifen einer Entnahmestelle     \_\_\_ \_\_\_  
                           Schrittspannung in Volt                             von \_\_\_ \_\_\_ bis \_\_\_ \_\_\_  
                           Stromstärke in Ampere                                 von \_\_ , \_\_ bis \_\_ , \_\_

**Sammelergebnis:**    *Lumbricus terrestris*                    *Aporrectodea longa*

___ ___ ___ g Gewicht des nach 24 Stunden abgesammelten Kotes	_____ Datum / Unterschrift
___ ___ ___ g Gewicht des nach 120 Stunden abgesammelten Kotes	_____ Datum / Unterschrift
___ ___ ___ g Gesamtgewicht des abgesammelten Kotes	_____ Datum / Unterschrift
___ ___ ___ Anzahl der Regenwürmer ohne Darminhalt	_____ Datum / Unterschrift
___ ___ ___ g Gewicht der Regenwürmer ohne Darminhalt	_____ Datum / Unterschrift

#### Lagerung

Nummer ESG	leer [g]	
		abgesammelter Kot
		Regenwürmer ohne Darminhalt



