

DIN EN ISO 15952

ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken –
Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch
Bodenverunreinigung (ISO 15952:2006);
Deutsche Fassung EN ISO 15952:2011**

Soil quality –

Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) –

Determination of the effects on growth by soil contamination (ISO 15952:2006);

German version EN ISO 15952:2011

Qualité du sol –

Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) –

Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol (ISO 15952:2006);

Version allemande EN ISO 15952:2011

Gesamtumfang 44 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm ist die deutsche Fassung der vom Technischen Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) ausgearbeiteten Norm EN ISO 15952, die in Deutsch, Englisch und Französisch herausgegeben wurde.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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 11267	siehe DIN ISO 11267
ISO 11268-1	siehe DIN ISO 11268-1
ISO 11268-2	siehe DIN ISO 11268-2
ISO 11269-2	siehe DIN ISO 11269-2
ISO 11274	siehe DIN ISO 11274
ISO 11465	siehe DIN ISO 11465
ISO 16387	siehe DIN ISO 16387

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 11267, *Bodenbeschaffenheit — Hemmung der Reproduktion von Collembolen (Folsomia candida) durch Bodenschadstoffe*

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

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

DIN ISO 11269-2, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 2: Wirkung von kontaminierten Böden auf Saataufgang und frühes Wachstum höherer Pflanzen*

DIN ISO 11274, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren*

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

DIN ISO 16387, *Bodenbeschaffenheit — Wirkung von Schadstoffen auf Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) — Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung und das Überleben*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit —
Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken —
Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch
Bodenverunreinigung
(ISO 15952:2006)

Soil quality —
Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) —
Determination of the effects on growth by soil
contamination
(ISO 15952:2006)

Qualité du sol —
Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles
(Helicidae) —
Détermination des effets sur la croissance par
contamination du sol
(ISO 15952:2006)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 10. Juni 2011 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Prüfumgebung	8
6 Reagenzien	8
7 Geräte.....	10
8 Lagerung und Vorbereitung der Proben	10
8.1 Zu prüfender Boden.....	10
8.2 Abfälle	11
9 Durchführung.....	11
9.1 Vorbereitung der Prüfung	11
9.2 Verteilung der Prüfmischung	13
9.3 Einbringen von Futter	13
9.4 Einbringen des biologischen Materials	13
9.5 Handhabungen während der Prüfungen	13
10 Referenzsubstanz	15
11 Berechnungen und Angabe der Ergebnisse.....	16
11.1 Berechnungen.....	16
11.2 Angabe der Ergebnisse.....	17
12 Gültigkeit der Prüfergebnisse für <i>Helix aspersa aspersa</i>	19
13 Prüfbericht.....	20
Anhang A (normativ) Statisches Verfahren.....	21
Anhang B (informativ) Anzuchtverfahren für Schnecken	22
Anhang C (informativ) Beispiel für die Zusammensetzung eines Schneckenfutters	28
Anhang D (informativ) Beispiel für eine Datentabelle	29
Anhang E (informativ) Beispiele für Ergebnisse mit <i>Helix aspersa aspersa</i>	30
Anhang F (informativ) Bestimmung der Wirkungen von Nahrungskontamination auf das Wachstum.....	33
Anhang G (informativ) Durchführung der Prüfung mit anderen Schneckenarten.....	37
Literaturhinweise	38

Vorwort

Der Text von ISO 15952:2006 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 15952:2011 durch das Technische Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ übernommen, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2011, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2011 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 15952:2006 wurde vom CEN als EN ISO 15952:2011 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Aufgrund der begrenzten Menge an Daten, die in Bezug auf die Toxizität von Kontaminanten für Bodenorganismen zur Verfügung stehen, geben die Probleme bei der Bewertung der Ökotoxizität von Böden und Abfällen sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene Anlass zu ernster Besorgnis. In den derzeit verfügbaren Prüfungen ist die Verwendung von Organismen der Bodenfauna auf die Stämme der Annelida (Regenwürmer und *Enchytraeidae*) und Arthropoden (Insekten: Collembola und Coleoptera) beschränkt. Zu Letzteren zählen zwei Normen zur Beurteilung der akuten Toxizität [Regenwürmer (ISO 11268-1) und Käferlarven [5]] und drei andere Normen zur Beurteilung subletaler Wirkungen von Bodenkontaminanten auf die Fortpflanzung (Regenwürmer [2], Collembola [1], *Enchytraeidae* [3]). Aus den biologischen Zyklen von Organismen ergibt sich, dass das Wachstum, wie die Fortpflanzung, ein grundlegender ökophysiologischer Parameter ist, der in Bezug auf die Zukunftsfähigkeit von Arten und Ökosystemen zu berücksichtigen ist [33].

Schnecken sind einschlägige Ökoindikatoren zur Bewertung der Bodenbeschaffenheit [15], da sie charakteristisch für die atmosphärische Grenzschicht des Bodens sind (saprophag und phytophag), in dem ein großer Teil ihres biologischen Zyklus stattfindet (Eiablage, Schlüpfen, Anfangsstadien der Entwicklung, Winterruhe usw.) [6], [17], [26]. Während der anderen Phasen ihres Zyklus fressen sie Boden, befinden sich über die schleimbedeckte Fußsole (Fuß) in Kontakt mit dem Boden und sind am ständigen Austausch mit dem Boden beteiligt (Wasser, Mineralsalze, Ausscheidungen und letztendlich Gehäuse und organische Substanz, wenn sie sterben) [6], [17], [28]. Außerdem stellen sie ein wichtiges Verbindungsglied zwischen den Pflanzen, der Tierwelt und den Bodenmikroorganismen dar. Sie erfüllen vollständig die Kriterien für einen guten Bioindikator: einfache Probenahme und Identifizierung, weite Verbreitung; Anreicherung von Kontaminanten [8, 10 bis 14, 16, 17, 19, 21, 26, 27, 35 bis 43]; ihre ökologischen und physiologischen Eigenschaften sind gut bekannt [6], [9], [29]; sie sind mittlerweile leicht unter kontrollierten Bedingungen zu züchten [19], [23], [29]. Ihre Empfindlichkeit gegenüber herkömmlichen Kontaminanten ihrer Umgebung wurde nachgewiesen [10 bis 15, 18 bis 27, 32, 33, 36 bis 42].

Die vorliegende Internationale Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von Substanzen, Zubereitungen, Böden oder Abfällen, die einem künstlichen oder natürlichen Boden zugegeben werden, auf das Überleben und Wachstum von jungen Schnecken. Somit kann das beschriebene Verfahren angewendet werden, um verunreinigte Böden zu prüfen oder um verschiedene nicht verunreinigte Böden zu vergleichen. Die empfohlene Art ist *Helix aspersa aspersa* Müller (gewöhnlich auch als Gemeine Gartenschnecke, Braune Gartenschnecke, Gartenschnecke, Landschnecke, „Petit-Gris“ bezeichnet). Unter den Landschnecken (Landlungenschnecken der Familie *Helicidae*) ist *Helix aspersa aspersa* Müller am weitesten verbreitet. Diese paläarktische Art kann sich an Gebiete mit unterschiedlichen Klimaarten anpassen: an Mittelmeer-, gemäßigtes ozeanisches, gemäßigtes mittellkontinentales und sogar tropisches Klima. *Helix aspersa aspersa* Müller stammt ursprünglich aus Europa und wurde in alle Teile der Welt eingeschleppt/eingeführt. Mittlerweile ist sie auf allen Kontinenten, mit Ausnahme der Antarktis, zu finden.

Allerdings nehmen Schnecken in ihrer natürlichen Umgebung Kontaminanten durch Kontakt (mit verschiedenen Substraten, wie z. B. Boden, Bodensickerwasser, Pflanzenstreu) und durch orale Aufnahme (von Pflanzen und Boden) sowie über die Atemwege [6], [26] auf. Daher steht für spezielle Prüfzwecke (zum Beispiel die Beurteilung der Toxizität von Pestiziden) optional ein anderer Prüfaufbau zur Verfügung, der auf die Exposition durch Nahrungsaufnahme ausgerichtet ist (Anhang F und Literaturhinweis [4]).

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein semistatisches (halbkontinuierliches) Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von Kontaminanten auf das Wachstum und Überleben von jungen Schnecken, üblicherweise *Helix aspersa aspersa* Müller (*Cornu aspersum*), fest. Die Tiere werden unter Verwendung eines Prüfsubstrats (künstlicher oder natürlicher Boden in Abhängigkeit von der Zielsetzung der Studie), dem festgelegte Mengen von Folgendem zugesetzt werden, über den Haut- und Verdauungspfad exponiert:

- Substanzen oder Zubereitungen;
- Böden (verunreinigte (kontaminierte) oder von unbekannter Beschaffenheit) oder Abfälle.

Zusätzlich zu dem semistatischen Verfahren darf ein statisches Verfahren angewendet werden (optional). Dieses Verfahren ist in Anhang A beschrieben.

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

Diese Prüfung berücksichtigt mögliche Veränderungen der Prüfsubstanz, der Zubereitung, des Bodens oder Abfalls, weil im Verlauf der 28-tägigen Prüfdauer die Prüfmischung alle 7 Tage hergestellt und ausgewechselt wird.

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

ISO 11269-2, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants*

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

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

EN 14735, *Charakterisierung von Abfällen — Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Prüfsubstrat

künstlicher oder natürlicher Boden, der als Kontrolle und Substrat zum Verdünnen verwendet wird

3.2

Matrix

zu prüfender Boden oder Abfall

3.3

Prüfmischung

Mischung der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix mit dem Prüfsubstrat

3.4

Wachstum

Zunahme der Biomasse, d. h. der gesamten Frischmasse (Körper und Gehäuse) der Organismen und Zunahme des maximalen Gehäusedurchmessers zwischen dem Beginn und dem Ende der Prüfung

ANMERKUNG Das Wachstum wird in Form eines Wachstumskoeffizienten angegeben.

3.5

Wirkungskonzentration

en: **effect concentration**

EC_x

Konzentration, bei der eine bestimmte Wirkung zu beobachten ist; *x* ist die (10-, 25-, 50-)prozentige Ausprägung dieser Wirkung, z. B. der Wachstumshemmung

BEISPIEL EC₅₀ ist diejenige geschätzte Konzentration, bei der am Prüfende eine 50%ige Minderung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle auftritt.

3.6

mittlere letale Konzentration

en: **median lethal concentration**

LC₅₀

Konzentration der Substanz, der am Anfang vorliegenden Prüfzubereitung oder die Konzentration der Matrix, die 50 % der geprüften Schnecken tötet

3.7

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

en: **lowest observed effect concentration**

LOEC

niedrigste in der Prüfung verwendete Konzentration, bei der die Prüfsubstanz im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) hat

ANMERKUNG Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC haben eine nachteilige Wirkung, die gleich oder größer ist als die, die bei der LOEC vorliegt. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, sollte die Bestimmung der LOEC (und damit auch der NOEC) detailliert erklärt werden.

3.8

Konzentration, bei der keine Wirkung zu beobachten ist en: no observed effect concentration

NOEC

Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der im Vergleich zur Kontrolle innerhalb einer definierten Expositionsdauer keine statistisch signifikante Wirkung ($p > 0,05$) zu beobachten ist

ANMERKUNG 1 NOEC ist die Konzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

ANMERKUNG 2 Die Ergebnisse für 3.5, 3.6, 3.7 und 3.8 werden wie folgt angegeben:

- als Trockenmasse der Prüfsubstanz oder -zubereitung je Trockenmasse Prüfsubstrat;
- als Massenanteil in Prozent der geprüften Matrix in der Prüfmischung (angegeben als Trockenmasse).

4 Kurzbeschreibung

Jungtiere von Landschnecken (üblicherweise *Helix aspersa aspersa* Müller) werden über einen Zeitraum von 28 Tagen einer Prüfmischung ausgesetzt, die unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix enthält. Die Prüfmischung wird alle 7 Tage frisch hergestellt und ausgewechselt.

In Abhängigkeit von der Zielsetzung kann die Prüfmischung mit künstlichem Boden (6.3.2) oder mit einem geeigneten natürlichen Boden (6.3.3) hergestellt werden.

Die Schnecken werden während der Prüfung mit nicht verunreinigter Nahrung gefüttert.

Die Wirkungen auf das Wachstum (Frischmasse und Gehäusedurchmesser) und auf das Überleben werden nach einer Expositionszeit von 28 Tagen gemessen (optional können die Wirkungen im Verlauf der 28 Tage alle 7 Tage gemessen werden).

Die während der Prüfung erhaltenen Ergebnisse werden mit denen einer Kontrolle verglichen, um die NOEC oder LOEC zu bestimmen und eine Schätzung der Konzentration zu ermöglichen, bei der das Wachstum der Schnecken innerhalb von 28 Tagen bezogen auf die Frischmasse [$EC_{50,m}(28 \text{ Tage})$] und den Gehäusedurchmesser [$EC_{50,d}(28 \text{ Tage})$] oder andere Werte von EC_x um 50 % verringert wird.

Wenn die gewählten Konzentrationen zu letalen Wirkungen führen, werden die während der Prüfung erhaltenen Ergebnisse mit denen der Kontrolle verglichen und zur Schätzung der Konzentration verwendet, bei der 50 % der Schnecken getötet werden [$LC_{50}(28 \text{ Tage})$].

Bei bestimmten Anwendungen können verschiedene Parameter (EC_x , NOEC, LOEC, LC_{50}) (optional) nach Expositionszeiten von weniger als 28 Tagen (7 Tage, 14 Tage, 21 Tage) beurteilt werden.

Die Prüfung wird in zwei Schritten durchgeführt:

- ein Vorversuch zur Ermittlung sowohl der Konzentration, bei der keine Wirkung zu beobachten ist, NOEC, als auch der Konzentration, die zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums führt. Die resultierende Dosis-Wirkungs-Beziehung ist für die ordnungsgemäße Planung der Hauptprüfung wichtig;
- eine Hauptprüfung, bei der die Konzentrationen bestimmt werden, die zwischen 10 % und 90 % Wachstumshemmung verursachen. Waren im Vorversuch bei der maximalen geprüften Konzentration keine Hemmwirkungen erkennbar, ist die Durchführung einer Hauptprüfung nicht notwendig.

5 Prüfungsumgebung

Die Prüfung ist bei einer Temperatur von $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 18 h zu 6 h durchzuführen. Die Lichtstärke (künstliches Tageslicht) muss bei fehlendem Tageslicht im Prüfbehälter 50 lx bis 100 lx betragen.

6 Reagenzien

6.1 Wasser mit einer Reinheit, die der von vollentsalztem Wasser entspricht.

6.2 Biologisches Material

Als Prüforganismen sind juvenile Schnecken zu verwenden. Die empfohlene Art ist *Helix aspersa aspersa* Müller; die Schnecken müssen zwischen 3 und 5 Wochen alt sein, eine mittlere Frischmasse von $(1 \pm 0,3)$ g und einen Gehäusedurchmesser von $(15,5 \pm 1)$ mm aufweisen.

ANMERKUNG Die Verwendung einer anderen Gattung und/oder Art von *Helicidae* ist möglich (siehe Beispiele und Bedingungen in Anhang G).

Die Schnecken sind einer synchronen Anzucht zu entnehmen, um eine möglichst homogene Population (Grundgesamtheit) in Bezug auf Größe, Masse und Alter zu bilden. Die Anzuchtverfahren für Schnecken sind in Anhang B beschrieben. Nach einer Aufzuchtphase (3 bis 5 Wochen, siehe Anhang B) sind die jungen Schnecken nach mindestens einer Woche und höchstens 5 Monaten Aestivation (Sommer-/Trockenruhe) zu verwenden. Die Sommerruhe erfolgt in runden Holzkisten (mit einem Durchmesser von etwa 12 cm und einer Höhe von etwa 4 cm), wobei die Schnecken unter trockenen Bedingungen bei einer Temperatur von 17°C bis 20°C gehalten werden.

Zwei bis drei Tage vor Beginn der Prüfung müssen die Schnecken geweckt werden, indem Wasser (6.1) in die für die Sommerruhe verwendeten Kisten gesprüht wird. Der Anteil der Schnecken, der nicht erwacht, muss weniger als 10 % betragen. Sobald sie wieder aktiv sind (Schnecken, die nicht mehr an den Wänden der Kiste haften und beginnen herauszukriechen), sind die Schnecken in eine Kiste (7.1) zu überführen, die mit Wasser (6.1) befeuchtet wurde. Der Boden dieser Kiste kann entweder mit saugfähigem Papier bedeckt sein, das ebenfalls befeuchtet wurde, oder er kann eine bestimmte Menge Prüfsubstrat (6.3) enthalten, das zu 50 % bis 60 % des Wasserrückhaltevermögens befeuchtet ist. Zwischen dem Aufwachen und dem Beginn der Prüfung (2 bis 3 Tage) sind die Schnecken zu füttern (6.4).

6.3 Prüfsubstrat

6.3.1 Allgemeines

In Abhängigkeit von den Zielsetzungen der Studie wird entweder ein künstlicher Boden (6.3.2) oder ein geeigneter natürlicher Boden (6.3.3) als Prüfsubstrat verwendet.

ANMERKUNG Künstlicher Boden darf als Kontrolle und als Verdünnungssubstrat zur Beurteilung der Wirkung einer Substanz oder einer Zubereitung, zum Vergleich verschiedener Böden oder Abfälle oder zur Beurteilung der Wirkungen eines verunreinigten Bodens verwendet werden.

Natürlicher Boden (Feldboden) darf als Kontrolle und als Verdünnungssubstrat zum Beispiel zur Beurteilung der Wirkung des Einmischens von Klärschlamm in den Feldboden oder zur Prüfung der Wirkung eines verunreinigten Bodens (in diesem Fall sollte ein nicht verunreinigter Boden, der mit der zu prüfenden Bodenprobe vergleichbar ist, verwendet werden) verwendet werden.

6.3.2 Künstlicher Boden

Der künstliche Boden muss die folgende Zusammensetzung aufweisen (wie in ISO 11268-1 festgelegt).

Tabelle 1 — Zusammensetzung von künstlichem Boden

Zusammensetzung	Prozentualer Anteil bezogen auf Trockenmasse
Sphagnum-Torf, luftgetrocknet, fein gemahlen, (2 ± 1) mm, ohne sichtbare Pflanzenreste	10 %
Kaolin, vorzugsweise mit mindestens 30 % Kaolinit	20 %
luftgetrockneter Industrie-Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu einem Massenanteil von mehr als 50 % eine Korngröße von 0,05 mm bis 0,2 mm aufweist)	etwa 69 % (in Abhängigkeit von der benötigten Menge an CaCO_3)
Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, analysenrein), um den pH-Wert des befeuchteten künstlichen Bodens auf einen Wert von $6,0 \pm 0,5$ einzustellen	etwa 0,3 % bis 1,0 %

Der künstliche Boden ist mindestens zwei Tage vor Beginn der Prüfung herzustellen, indem die vorstehend aufgeführten trockenen Bestandteile gründlich in einem großen Labormischgerät gemischt werden. Die erforderliche Menge an Calciumcarbonat kann in Abhängigkeit von den Eigenschaften der jeweiligen Charge (vor allem des Torfes) schwanken und sollte unmittelbar vor der Prüfung durch Messung von Teilproben bestimmt werden.

Der gemischte künstliche Boden ist mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur zu lagern, um den Säuregehalt ins Gleichgewicht zu bringen. Für die Bestimmung des pH-Wertes und des Gesamtwasserrückhaltevermögens muss der trockene künstliche Boden einen oder zwei Tage vor Beginn der Prüfung vorbefeuchtet werden, indem hinreichend vollentsalztes Wasser zugesetzt wird, so dass die Hälfte des erforderlichen endgültigen Wassergehaltes von 50 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens erreicht wird.

Der pH-Wert ist nach ISO 10390 zu bestimmen. Liegt der gemessene pH-Wert nicht im erforderlichen Bereich, ist eine ausreichende Menge CaCO_3 hinzuzufügen oder eine neue Charge des künstlichen Bodens herzustellen. Das Gesamtwasserrückhaltevermögen des künstlichen Bodens ist nach ISO 11274 oder Anhang A von ISO 11269-2 zu bestimmen.

6.3.3 Natürlicher Boden

An dem ausgewählten natürlichen Boden, der zum Entfernen von großen Fragmenten durch ein Sieb mit quadratischen Maschen von 4 mm zu sieben ist, sind die folgenden Parameter zu bestimmen:

- pH-Wert nach ISO 10390;
- Wasserrückhaltevermögen nach ISO 11274 oder nach Anhang A von ISO 11269-2;
- Wassergehalt nach ISO 11465;
- Gehalt an organischer Substanz nach ISO 10694.

Es wird auch empfohlen, die Kationenaustauschkapazität nach ISO 11260 zu bestimmen.

6.4 Futter

Das Futter muss in Form von Mehl mit natürlichem Wassergehalt (5 % bis 10 %) bereitgestellt werden.

Um ein hinreichendes Wachstum zu erreichen, wird empfohlen, die Prüfungen mit einem mehlbasierten Futter durchzuführen, das aus Getreide, Grünfutter, Mineralsalzen und Vitaminen besteht und das die Bedürfnisse der Schnecken ausreichend abdeckt¹⁾. Ein Beispiel für die Zusammensetzung eines Futters ist in Anhang C angeführt.

7 Geräte

Eine übliche Laborausrüstung einschließlich der folgenden Materialien ist erforderlich.

7.1 Prüfbehälter

Einweg-Mäusekäfige aus transparentem Polystyren²⁾ oder ein anderer Behälter mit einem Volumen von etwa 1,6 l [empfohlene Ungefährmaße: 24 cm (Länge) × 10,5 cm (Breite) × 8 cm (Höhe)].

7.2 Behälter für das Futter

Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 5,5 cm und einer Höhe von etwa 1 cm, oder beliebige andere Behälter mit gleichwertigen Maßen.

7.3 Messschieber, mit einer Präzision von 0,1 mm.

7.4 Waagen

Eine Analysenwaage mit einer Präzision von mindestens 1 mg. Zwei weitere Waagen, eine mit einer Präzision von 0,1 g, eine andere mit einer Präzision von 1 g.

8 Lagerung und Vorbereitung der Proben

8.1 Zu prüfender Boden

Im Laboratorium eingegangene Bodenproben sind nach ISO 10381-6 zu lagern.

Die Bodenprobe, die der Prüfung unterzogen wird, ist zum Entfernen von groben Fragmenten durch ein Sieb mit quadratischen Maschen von 4 mm zu sieben.

Für jeden Boden sind dieselben Kennwerte zu bestimmen wie für natürlichen Boden (6.3.3), der als Kontrolle oder Verdünnungssubstrat verwendet werden kann.

1) Das Schneckenfutter „Helixal“, das von Établissements Chays Frères, 6, rue du Collège, BP 21, 25800 Valdahon, Frankreich, hergestellt und vertrieben wird, oder die Schneckenfutter-Formulierung von INRA, die von Établissements Berton SARL, Lieu-dit Berton/Départementale 23, 85510 Le Boupère, Frankreich, hergestellt und vertrieben wird, oder das Schneckenfutter, das von UCAAB, rue de l'Église, BP 19, 02400 Château-Thierry Cedex, Frankreich, hergestellt und vertrieben wird, sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.

2) Die transparenten Einweg-Mäusekäfige aus Polystyren mit der Bezugsnummer E1DBBAC001, vertrieben durch Charles River Laboratories France, BP 0109, 69592 L'Arbresle Cedex, Frankreich, sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.