

DIN EN ISO 15952



ICS 13.080.30

Ersatz für
DIN EN ISO 15952:2011-09

**Bodenbeschaffenheit –
Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken
(Helicidae) –
Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch
Bodenverunreinigung (ISO 15952:2018);
Deutsche Fassung EN ISO 15952:2018**

Soil quality –
Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) –
Determination of the effects on growth by soil contamination (ISO 15952:2018);
German version EN ISO 15952:2018

Qualité du sol –
Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) –
Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol (ISO 15952:2018);
Version allemande EN ISO 15952:2018

Gesamtumfang 46 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15952:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird

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

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften (z. B. Datensicherheitsblätter) zu beachten.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 10390	siehe	DIN ISO 10390
ISO 10694	siehe	DIN ISO 10694
ISO 11260	siehe	DIN EN ISO 11260
ISO 11267:2014	siehe	DIN EN ISO 11267:2014-07
ISO 11268-1	siehe	DIN EN ISO 11268-1
ISO 11268-2:2012	siehe	DIN EN ISO 11268-2:2015-11
ISO 11269-2	siehe	DIN EN ISO 11269-2
ISO 11274	siehe	DIN EN ISO 11274
ISO 11465	siehe	DIN EN ISO 11465
ISO 16387:2014	siehe	DIN EN ISO 16387:2014-05
ISO 18400-206	siehe	DIN ISO 18400-206
ISO 20963:2005	siehe	DIN EN ISO 20963:2011-09

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 15952:2011-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) In Anhang G weitere geeignete Schneckenarten (*Theba pisana*, *Eobania vermiculata*, *Otala lactea*) ergänzt;
- b) Referenzen in den Literaturhinweisen ergänzt, die zeigen, dass
 - Schnecken zur Bewertung der Wirkung einiger organischer Verbindungen oder von Gentechnik verwendet wurden;
 - das Verfahren angepasst wurde, um die Toxikokinetik oder Toxikodynamik von Metallen sowie den Einfluss von Bodenparametern zu bewerten;
- c) die Norm redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 15952: 2011-09

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 11267:2014, *Bodenbeschaffenheit — Hemmung der Reproduktion von Collembolen (Folsomia candida) durch Verunreinigungen (ISO 11267:2014); Deutsche Fassung EN ISO 11267:2014*

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

DIN EN ISO 11268-2:2015-11, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida/Eisenia andrei (ISO 11268-2:2012); Deutsche Fassung EN ISO 11268-2:2015*

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

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

DIN EN ISO 16387:2014-05, *Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Verunreinigungen auf Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) — Bestimmung der Wirkungen auf die Reproduktion (ISO 16387:2014); Deutsche Fassung EN ISO 16387:2014*

DIN EN ISO 20963:2011-09, *Bodenbeschaffenheit — Auswirkungen von Schadstoffen auf Insektenlarven (Oxythyrea funesta) — Bestimmung der akuten Toxizität (ISO 20963:2005); Deutsche Fassung EN ISO 20963:2011*

DIN ISO 10390^{*)}, *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes*

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

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

^{*)} DIN ISO 10390 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15933:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall und Boden — Bestimmung des pH-Werts“ angewendet werden.

^{**)} DIN ISO 10694 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15936:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall, Boden und Abfall — Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) mittels trockener Verbrennung“ angewendet werden.

^{***)} DIN ISO 11465 wurde zurückgezogen, dafür kann DIN EN 15934:2012-11 „Schlamm, behandelter Bioabfall, Boden und Abfall — Berechnung des Trockenmassenanteils nach Bestimmung des Trockenrückstands oder des Wassergehalts“ angewendet werden.

DIN ISO 18400-206, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 206: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Beurteilung von biologischen funktionalen und strukturellen Endpunkten im Labor*

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit —
Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere
von Landschnecken (Helicidae) —
Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum
durch Bodenverunreinigung
(ISO 15952:2018)

Soil quality —
Effects of pollutants on juvenile
land snails (Helicidae) —
Determination of the effects on growth by soil
contamination
(ISO 15952:2018)

Qualité du sol —
Effets des polluants vis-à-vis des escargots
juvéniles (Helicidae) —
Détermination des effets sur la croissance par
contamination du sol
(ISO 15952:2018)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 15. Juni 2018 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
5 Prüfumgebung	10
6 Reagenzien	10
7 Geräte	12
8 Lagerung und Vorbereitung der Proben	12
8.1 Zu prüfender Boden	12
8.2 Abfälle	12
9 Durchführung	13
9.1 Vorbereitung der Prüfung	13
9.1.1 Wahl der zu prüfenden Konzentrationen	13
9.1.2 Herstellung der Prüfmischungen	13
9.2 Verteilung der Prüfmischung	15
9.3 Einbringen von Futter	15
9.4 Einbringen des biologischen Materials	15
9.5 Handhabungen während der Prüfungen	15
9.5.1 Allgemeines	15
9.5.2 Routinebehandlung	15
9.5.3 Wöchentliche Aufgabe	16
10 Referenzsubstanz	17
11 Berechnungen und Angabe der Ergebnisse	17
11.1 Berechnungen	17
11.2 Angabe der Ergebnisse	18
12 Gültigkeit der Prüfergebnisse	20
13 Prüfbericht	20
Anhang A (informativ) Statisches Verfahren	22
Anhang B (informativ) Anzuchtverfahren für Schnecken	23
Anhang C (informativ) Beispiel für die Zusammensetzung von Schneckenfutter	29
Anhang D (informativ) Beispiel für eine Datentabelle	30
Anhang E (informativ) Beispiele für Ergebnisse mit <i>Helix aspersa aspersa</i>	31
Anhang F (informativ) Bestimmung der Wirkungen von Nahrungskontamination auf das Wachstum	34

Anhang G (informativ) Geeignete andere Schneckenarten	38
Literaturhinweise.....	39

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15952:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2019 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 15952:2011.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 15952:2018 wurde von CEN als EN ISO 15952:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological characterization* erarbeitet

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 15952:2006), die technisch überarbeitet wurde.

Einleitung

Aufgrund der begrenzten Menge an Daten, die in Bezug auf die Toxizität von Kontaminanten für Bodenorganismen zur Verfügung stehen, gibt die 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 beschränkt (Insekten: Collembola und Coleoptera). Unter den relevanten Normen dienen zwei der Beurteilung der akuten Toxizität [Regenwürmer (ISO 11268-1) und Käferlarven [6]] und drei andere Normen behandeln die subletalen Wirkungen von Bodenkontaminanten auf die Fortpflanzung (Regenwürmer [3], Collembolen [2], *Enchytraeidae* [4]). 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 [38].

Schnecken sind relevante Ökoindikatoren zur Bewertung der Bodenbeschaffenheit (siehe Literaturhinweise [16][18] bis [20][32][33][40] bis [42]), 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.) [7][18][29]. 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) [7][18][31]. 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 (siehe Literaturhinweise [9][11] bis [15], [17][18][22], [24][29][30], [33] bis [48]); ihre ökologischen und physiologischen Eigenschaften sind gut bekannt [7][10][32]; sie sind mittlerweile leicht unter kontrollierten Bedingungen zu züchten [22][26][32]. Ihre Empfindlichkeit gegenüber herkömmlichen Kontaminanten ihrer Umgebung wurde nachgewiesen (siehe Literaturhinweise [11] bis [16], [19] bis [28], [30], [33] bis [38], [37] bis [48]).

Diese Internationale Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von Substanzen, Zubereitungen (d. h. Mischungen oder Lösungen aus zwei oder mehr Substanzen), 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; Synonyme: *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum* [56]). 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 mediterranes, 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 [10], 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 [7][29] auf. Daher steht für spezielle Prüfzwecke (z. B. die Beurteilung der Pestizidtoxizität) optional ein anderer Prüfaufbau zur Verfügung, der auf die Exposition durch Nahrungsaufnahme ausgerichtet ist (Anhang F und Literaturhinweis [6]).

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein semistatisches (halbkontinuierliches) Verfahren zur Bestimmung der Wirkungen von Kontaminanten auf das Wachstum und Überleben von jungen Schnecken, üblicherweise *Helix aspersa aspersa* Müller, 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, Mischungen oder Zubereitungen;
- Böden (verunreinigte (kontaminierte) oder von unbekannter Beschaffenheit) oder Abfälle.

Diese Prüfung berücksichtigt mögliche Veränderungen der Prüfsubstanz, der Vorbereitung, des Bodens oder Abfalls, weil im Verlauf der 28-tägigen Prüfdauer die Prüfmischungen jede Woche hergestellt und erneuert werden.

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

Dieses Verfahren gilt nicht für Substanzen, bei denen der Luft/Boden-Verteilungskoeffizient größer als eins ist, oder für Substanzen mit einem Dampfdruck, der 300 Pa bei 25 °C übersteigt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 quality — Determination of pH*

ISO 18400-206, *Soil quality — Sampling — Part 206: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of biological functional and structural endpoints in the laboratory*

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 — Part 1: Determination of acute toxicity to Eisenia fetida/Eisenia andrei*

ISO 11269-2:2012, *Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early 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.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Prüfsubstrat

künstlicher oder natürlicher Boden, der als Kontroll- und Verdünnungssubstrat verwendet wird

3.2

Matrix

zu prüfender Boden oder Abfall

3.3

Prüfmischung

Mischung der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix mit dem *Prüfsubstrat* (3.1)

3.4

Wachstum

<Biomasse> Zunahme der Biomasse, d. h. der gesamten Frischmasse (Körper mit Gehäuse) der Organismen zwischen dem Beginn und dem Ende der Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese wird als Koeffizient für die Zunahme der Biomasse $k_{GC,m}$ angegeben.

3.5

Wachstum

<Gehäuse> Zunahme des maximalen Gehäusedurchmessers zwischen dem Beginn und dem Ende der Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese wird als Koeffizient für die Zunahme des Gehäusedurchmessers $k_{GC,d}$ angegeben.

3.6

Wirkungskonzentration

EC_x

(en: effect concentration)

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

BEISPIEL EC_{50} ist diejenige geschätzte Konzentration, bei der am Prüfende eine 50%ige Minderung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle auftritt ($EC_{50,m}$ für die Biomassezunahme bzw. $EC_{50,d}$ für die Gehäusezunahme).

3.7

mittlere letale Konzentration

LC_{50}

(en: median lethal concentration)

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

3.8

geringste Konzentration, bei der eine Wirkung zu beobachten ist

LOEC

(en: lowest observed effect concentration)

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

Anmerkung 1 zum Begriff: 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.

3.9

Konzentration, bei der keine Wirkung zu beobachten ist NOEC

(en: no observed effect concentration)

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 zum Begriff: NOEC ist die Konzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Ergebnisse für 3.6, 3.7, 3.8 und 3.9 werden wie folgt angegeben:

- als Trockenmasse der Prüfsubstanz oder -zubereitung je Trockenmasse *Prüfsubstrat* (3.1);
- 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 d Prüfmischungen ausgesetzt, die unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix enthalten. Die Prüfmischungen werden alle 7 d frisch hergestellt und ausgewechselt.

In Abhängigkeit von der Zielsetzung der Studie dürfen die Prüfmischungen mit künstlichem Boden (siehe 6.3.2) oder mit einem geeigneten natürlichen Boden (siehe 6.3.3) hergestellt werden.

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

Die Wirkungen auf das Wachstum (Biomasse und Gehäusedurchmesser) und auf das Überleben werden nach einer Expositionszeit von 28 d gemessen (optional können die Wirkungen im Verlauf der 28 d alle 7 d 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 d bezogen auf die Frischmasse [$EC_{50,m}$ (28 d)] und den Gehäusedurchmesser [$EC_{50,d}$ (28 d)] 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 d)].

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

Die Prüfung wird in zwei Schritten durchgeführt:

- Eine Vorprüfung 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 in der Vorprüfung 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 (auch bekannt als *Cantareus aspersus* und *Cornu aspersum*), die Schnecken müssen zwischen 3 Wochen 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 Wochen 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 einen Prüfbehälter (7.1) zu überführen, der mit Wasser (6.1) befeuchtet wurde. Der Boden dieser Kiste ist entweder mit saugfähigem Papier bedeckt, 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 d bis 3 d) 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 (siehe 6.3.2) oder ein geeigneter natürlicher Boden (siehe 6.3.3) als Prüfsubstrat verwendet. Das Prüfsubstrat kann im trockenen oder im ursprünglichen Zustand (d. h. ohne Trocknung vor dem Gebrauch bei natürlichem Boden) verwendet werden.

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

Natürlicher Boden (Feldboden) darf als Kontroll- und Verdünnungssubstrat z. B. zur Beurteilung der Wirkung des Einmischens von Klärschlamm in den Feldboden oder zur Prüfung der Wirkung eines