

DIN EN ISO 15952

ICS 13.080.30

Entwurf

Einsprüche bis 2017-06-14
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 15952:2011-09

**Bodenbeschaffenheit –
Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken –
Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch
Bodenverunreinigung (ISO/DIS 15952:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15952:2017**

Soil quality –

Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) –

Determination of the effects on growth by soil contamination (ISO/DIS 15952:2017);

German and English version prEN ISO 15952:2017

Qualité du sol –

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

Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol (ISO/DIS 15952:2017);

Version allemande et anglaise prEN ISO 15952:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-04-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 83 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15952:2017) 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 vom 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

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 16387:2014	siehe	DIN EN ISO 16387:2014-05
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.

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*

— Leerseite —

Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken — Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch Bodenverunreinigung (ISO/DIS 15952:2017)

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) — Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol (ISO/DIS 15952:2017)

Soil quality — Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) — Determination of the effects on growth by soil contamination (ISO/DIS 15952:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Prüfumgebung	9
6 Reagenzien	9
7 Geräte	11
8 Lagerung und Vorbereitung der Proben	11
9 Durchführung	12
10 Referenzsubstanz	16
11 Berechnungen und Angabe der Ergebnisse	16
12 Gültigkeit der Prüfergebnisse	19
13 Prüfbericht	19
Anhang A (normativ) Statistisches 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) Geeignete andere Schneckenarten	37
Literaturhinweise	38

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15952:2017) 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 vom NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15952:2017 wurde vom CEN als prEN ISO 15952:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Die Internationale Norm ISO 15952 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological methods* 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, 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 [37].

Schnecken sind relevante Ökoindikatoren zur Bewertung der Bodenbeschaffenheit [15, 17 bis 19, 31, 32, 39 bis 41], 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], [28]. 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], [30]. 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, 21, 23, 28, 29, 32 bis 47]; ihre ökologischen und physiologischen Eigenschaften sind gut bekannt [6], [9], [31]; sie sind mittlerweile leicht unter kontrollierten Bedingungen zu züchten [21], [25], [31]. Ihre Empfindlichkeit gegenüber herkömmlichen Kontaminanten ihrer Umgebung wurde nachgewiesen [10 bis 15, 18 bis 27, 29, 32 bis 37, 36 bis 47].

Diese 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; Synonyme: *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum* [55]). 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 [9], 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], [28] 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 [5]).

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, 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 zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10390, *Soil 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 11260, *Soil quality — Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution*

ISO 11268-1, *Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 1: Determination of acute toxicity to Eisenia fetida/Eisenia andrei*

ISO 11269-2, *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.

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 1 zum Begriff: Das Wachstum wird in Form eines Wachstumskoeffizienten angegeben.

3.5

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 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

LC₅₀

(en: median lethal concentration)

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

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.

3.8

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 3.5, 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 Prüfmischungen ausgesetzt, die unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix enthalten. Die Prüfmischungen werden alle 7 Tage frisch hergestellt und ausgewechselt.

In Abhängigkeit von der Zielsetzung können die Prüfmischungen 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 Tage)] und den Gehäusedurchmesser [$EC_{50,d}$ (28 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 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 Prüfunggebung

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 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 Torfs) 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 Wassergehalts 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 ISO 11269-2:2012, Anhang C 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 ISO 11269-2:2012, Anhang C;
- 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 abdeckt. 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 Polystyren 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 Futterbehälter

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 18400-206 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.

8.2 Abfälle

Im Laboratorium eingegangene Abfallproben sind nach EN 14735 zu lagern [weniger als 2 Monate bei $(4 \pm 3) ^\circ\text{C}$].

Für die Durchführung der Prüfungen muss die Teilchengröße von Abfällen weniger als 4 mm betragen. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, muss die Teilchengröße des Abfalls so verringert werden, dass alle Teilchen durch ein Sieb mit quadratischen Maschen von 4 mm hindurchgehen.

9 Durchführung

9.1 Vorbereitung der Prüfung

9.1.1 Wahl der zu prüfenden Konzentrationen

9.1.1.1 Vorversuch

Diese Prüfung wird in einem großen Konzentrationsbereich durchgeführt.

- Vier Konzentrationen der Substanz oder Zubereitung und eine Kontrolle (z. B. 0 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 500 mg/kg und 1 000 mg/kg Prüfsubstrat) mit fünf Schnecken je Konzentration und Behälter. Der Vorversuch darf ohne Wiederholung durchgeführt werden.
- Vier verschiedene prozentuale Gehalte der zu untersuchenden Matrix und eine Kontrolle (z. B. 0 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 100 %) mit fünf Schnecken je prozentualem Gehalt und Behälter. Der Vorversuch darf ohne Wiederholung durchgeführt werden.

9.1.1.2 Hauptprüfung

Es ist ein Bereich von mindestens fünf Konzentrationen der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix auszuwählen, der einer geometrischen Folge entspricht, um den Bereich von Konzentrationen oder prozentualen Gehalten zu erfassen bzw. über ihn hinauszugehen, bei denen im Vorversuch keine Wirkung auf das Wachstum beobachtet wurde bzw. bei denen das Wachstum vollständig gehemmt wurde. Das Verhältnis dieser geometrischen Folge darf vorzugsweise nicht mehr als 2 betragen.

Beträgt das Verhältnis mehr als 2, sind zwei Konzentrationen erforderlich, bei denen die beobachtete Wirkung zwischen 10 % und 90 % liegt.

Bei der Hauptprüfung werden drei Wiederholungen je Konzentration durchgeführt.

9.1.2 Herstellung von Prüfmischungen

9.1.2.1 Allgemeines

Die Prüfmischung (3.3) besteht aus dem Prüfsubstrat und der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix. Es ist hinreichend Prüfmischung herzustellen, um den Boden des Prüfbehälters mit einer Schicht der Prüfmischung von mindestens 1 cm zu bedecken.

Wenn die Prüfsubstanz im ursprünglichen Zustand (ohne Trocknung vor dem Gebrauch) verwendet wird, ist deren Wassergehalt zu berücksichtigen, um die Konzentrationen in Milligramm Substanz oder Zubereitung je Kilogramm trockenes Prüfsubstrat bzw. bei Matrices als Massenanteil der Matrix in der Prüfmischung in Prozent (jeweils bezogen auf die Trockenmasse) anzugeben.

9.1.2.2 Wasserlösliche oder emulgierbare Substanzen und Zubereitungen

Für jede untersuchte Konzentration ist die zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderliche Menge der Prüfsubstanz oder -zubereitung in dem gleichen Wasser (6.1), das zum Befeuchten des Prüfsubstrats verwendet wird, zu lösen. Die Lösung ist über das trockene oder im ursprünglichen Zustand befindliche Prüfsubstrat (6.3) zu sprühen, anschließend ist alles sorgfältig zu mischen.

Die fertiggestellte Prüfmischung muss einen Wassergehalt aufweisen, der 50 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens (bestimmt nach ISO 11274 oder nach ISO 11269-2:2011, Anhang C) entspricht.

Der pH-Wert bei jeder Prüfkonzentration ist nach ISO 10390 zu bestimmen.

Auf ähnliche Weise ist bei der Kontrollbehandlung zu verfahren, jedoch ohne Zugabe der Prüfsubstanz oder -zubereitung.

Die Prüfung ist nach den Festlegungen in 9.2 fortzusetzen.

9.1.2.3 Substanzen und Zubereitungen, die in Wasser unlöslich, aber in organischen Lösemitteln löslich sind

Die zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderliche Menge der Prüfsubstanz oder -zubereitung ist in einem flüchtigen Lösemittel (z. B. Methanol oder Aceton) zu lösen. Die erhaltene Lösung ist auf das trockene oder im ursprünglichen Zustand befindliche Prüfsubstrat (6.3) zu sprühen. Alles ist sorgfältig zu mischen und das Lösemittel ist 24 h in einem Abzugsschrank verdampfen zu lassen.

Die Mischung ist mit Wasser (6.1) zu befeuchten, bis 50 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens (bestimmt nach ISO 11274 oder nach ISO 11269-2:2011, Anhang C) erreicht sind, anschließend ist alles sorgfältig zu mischen.

Der pH-Wert bei jeder Prüfkonzentration ist nach ISO 10390 zu bestimmen.

Auf ähnliche Weise ist bei der Kontrollbehandlung zu verfahren, jedoch ohne Zugabe der Prüfsubstanz oder -zubereitung.

Die Prüfung ist nach den Festlegungen in 9.2 fortzusetzen.

9.1.2.4 In Wasser und organischen Lösemitteln unlösliche Substanzen und Zubereitungen

Bei Substanzen oder Zubereitungen, die in einem flüchtigen Lösemittel unlöslich sind, ist ein Gemisch aus 10 g industriellem Quarzsand (6.3.2) (zuvor entnommen von der Menge an Sand, die für die Herstellung des Prüfsubstrats erforderlich ist) und der zum Erhalt der gewünschten Konzentration erforderlichen Menge der Prüfsubstanz oder -zubereitung herzustellen. Das auf diese Weise erhaltene Gemisch ist in einen mit dem trockenen oder im ursprünglichen Zustand befindlichen Prüfsubstrat (6.3) (abzüglich der für die Kontamination verwendeten 10 g) gefüllten Behälter zu geben. Alles ist sorgfältig zu mischen.

Die Mischung ist mit Wasser (6.1) zu befeuchten, bis 50 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens (bestimmt nach ISO 11274 oder nach ISO 11269-2:2011, Anhang C) erreicht sind, anschließend ist alles sorgfältig zu mischen.

Der pH-Wert bei jeder Prüfkonzentration ist nach ISO 10390 zu bestimmen.

Auf ähnliche Weise ist bei der Kontrollbehandlung zu verfahren, jedoch ohne Zugabe der Prüfsubstanz oder -zubereitung.

Die Prüfung ist nach den Festlegungen in 9.2 fortzusetzen.

9.1.2.5 Feste Matrices

Zunehmende Anteile der Prüfmatrix werden zu dem trockenen oder im ursprünglichen Zustand befindlichen Prüfsubstrat (6.3) gemischt (z. B. 0 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 100 %).

Die Kontrollbehandlung entspricht 0 % Prüfmatrix, d. h. 100 % künstlicher Boden (6.3.2) oder natürlicher Boden (6.3.3).

Die Mischung ist mit Wasser (6.1) zu befeuchten, bis 50 % bis 60 % des Gesamtwasserrückhaltevermögens (bestimmt nach ISO 11274 oder nach ISO 11269-2:2011, Anhang C) erreicht sind, anschließend ist alles

sorgfältig zu mischen. (Das zugefügte Wasser entspricht dem Volumen an Wasser, das zum erneuten Befeuchten der in der Mischung enthaltenen Menge an Prüfsupstrat erforderlich ist, und dem Volumen an Wasser, das zum erneuten Befeuchten der in der Mischung enthaltenen Menge an Matrix erforderlich ist.)

Falls es notwendig ist, den Wassergehalt der festen Matrices zu verringern, sind diese im Freien oder in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von höchstens 30 °C zu trocknen, um einen Verlust an flüchtigen Produkten auf ein Minimum herabzusetzen.

Der pH-Wert bei jeder Prüfkonzentration ist nach ISO 10390 zu bestimmen.

Die Prüfung ist nach den Festlegungen in 9.2 fortzusetzen.

9.2 Verteilung der Prüfmischung

Zur Vorbereitung der Prüfung ist eine hinreichende Menge an Prüfmischung (9.1.2) in die Prüfbehälter (7.1) zu geben, um den Boden der Prüfbehälter auf eine Höhe von mindestens 1 cm aufzufüllen.

ANMERKUNG Wenn das Prüfsupstrat (6.3) künstlicher Boden ist, beträgt die Menge der Prüfmischung für jeden Prüfbehälter etwa 140 g (Trockenmasse).

Die Oberfläche der Prüfmischung ist zu glätten und der Boden ist leicht zu verfestigen.

9.3 Einbringen von Futter

Der Behälter (7.2) mit dem Futter (6.4) ist auf den Boden des Prüfbehälters (7.1) zu stellen. Das Futter muss *ad libitum* bereitgestellt werden.

9.4 Einbringen des biologischen Materials

Für jeden Prüfbehälter (7.1) sind jeweils fünf Schnecken (6.2) nach dem Zufallsprinzip auszuwählen.

9.5 Handhabungen während der Prüfungen

9.5.1 Allgemeines

Die Behälter sind mit einer transparenten, perforierten Platte [z. B. aus Polyalkylmethacrylat (Plexiglas) mit den Ungefährmaßen 26,5 cm × 13,5 cm] abzudecken, die während der ersten beiden Wochen der Prüfung mit einer geeigneten Vorrichtung befestigt wird. Während der nächsten beiden Wochen wird als Abdeckung ein zweiter Behälter (7.1) verwendet, der umgedreht wird. Diese Anordnung verdoppelt das Volumen der Prüfkammer und verhindert somit einen negativen Gruppeneffekt auf das Wachstum der Schnecken (siehe Bild B.2).

ANMERKUNG Die Platte und der zum Abdecken des Prüfbehälters verwendete Behälter können mit 3 bis 4 Öffnungen mit einem Durchmesser von weniger als 2 mm versehen werden.

Die Prüfbehälter mit den Schnecken sind unter Prüfbedingungen (5) anzuordnen. Sie sind in regelmäßigen Zeitabständen zu betrachten und sämtliche Besonderheiten, die die Durchführung der Prüfung stören könnten, sind aufzuzeichnen.

9.5.2 Routinebehandlung

Dreimal wöchentlich (zum Beispiel Montag, Mittwoch und Freitag) sind bei jedem Prüfbehälter folgende Arbeitsschritte auszuführen.

- Mit einem Spatel sind regelmäßig die Ausscheidungsprodukte von der Prüfmischung zu entfernen, um dessen Anhäufung und die Bildung von Schimmel zu verhindern.

- Die Seitenwände des Behälters sind mit saugfähigem Papier, das mit Wasser (6.1) befeuchtet wurde, zu reinigen und der Deckel ist mit Leitungswasser abzuwaschen, abzutrocknen und erneut mit Wasser (6.1) zu befeuchten.
- Die Prüfmischung (9.1.2) ist durch Besprühen mit Wasser (6.1) so zu befeuchten, dass 50 % bis 60 % des Wasserrückhaltevermögens erreicht werden. Zur Sicherstellung, dass der Wassergehalt der Prüfmischung die gesamte Prüfdauer bei 50 % bis 60 % bleibt, ist es möglich, einen Behälter ohne Schnecken vorzubereiten, der in regelmäßigen Zeitabständen gewogen wird, um die Menge an Wasser zu schätzen, die in die Prüfbehälter zu sprühen ist.
- Das Futter (6.4) ist zu erneuern.

ANMERKUNG Es ist ratsam, wenn möglich, die vorstehend beschriebenen Arbeitsschritte zu bestimmten Zeiten (vormittags oder nachmittags) durchzuführen.

Sofern vorhanden, ist die Mortalität aufzuzeichnen.

9.5.3 Wöchentliche Aufgabe

Wenn die Wirkungen wöchentlich zu beurteilen sind (optional, siehe Abschnitt 4), werden die Schnecken jede Woche gewogen und gemessen. Wenn nicht, werden die Schnecken nur am Ende der Prüfung (nach 28 Tagen) gewogen und gemessen.

Alle 7 Tage:

- sind die Schnecken vor dem Auswechseln des Futters und dem Reinigen der Seitenwände und des Deckels einzeln zu wiegen (mit einer Präzision von 0,1 g) und der Gehäusedurchmesser ist zu messen (mit einer Präzision von 0,1 mm); siehe Bild 1;
- ist die Prüfmischung (9.1.2) durch eine frisch zubereitete zu ersetzen.



Bild 1 — Messen des Gehäusedurchmessers, d. h. des längsten Maßes, das gemessen werden kann
(weißer Pfeil auf dem Foto)

Die Masse der Schnecken kann eine Unsicherheit aufweisen, wenn an deren Gehäuse oder Fuß Prüfsubstrat haftet. Vor jedem Wägen ist das Substrat mit einem Spatel vom Gehäuse oder Fuß zu entfernen. Es ist möglich, die Schnecken auf dem sauberen Behälterdeckel oder einem leicht feuchten Papier zu belassen, damit sie sich darauf bewegen und sich so von dem am Fuß haftenden Substrat befreien.

An den Schnecken beobachtete deutliche oder pathologische Symptome (z. B. übermäßige Schleimbildung, vergrößerter ödematöser Körper, herabhängende Augenstiele, wie in den Literaturhinweisen [11] oder [41] beschrieben) oder ausgeprägte Verhaltensänderungen (z. B. Lethargie auf der Prüfmischung, mangelnde Nahrungsaufnahme) sind aufzuzeichnen.

Am Ende der Prüfung ist der pH-Wert in einem Kontrollbehälter und einem Behälter je Konzentration nach ISO 10390 zu messen. Es wird empfohlen, den pH-Wert aller Behälter zu messen, in denen die Mortalitätsrate (Sterblichkeitsrate) oder Wachstumsrate ungewöhnlich ist.

Optional: Am Ende der Prüfung (nach 28 Tagen) sind die Schnecken aus jedem Behälter nach dem abschließenden Wägen und Messen des Gehäusedurchmessers 48 h in feuchten Behältern ohne Prüfsubstrat fasten zu lassen (bis sie nichts mehr ausscheiden), anschließend sind sie für eine mögliche Analyse der in den Geweben oder Organen vorliegenden Konzentration von Kontaminanten tiefzufrieren.

10 Referenzsubstanz

Regelmäßig wird eine Kontrollprüfung mit einer Referenzsubstanz durchgeführt, um das Auftreten von Änderungen hinsichtlich der Empfindlichkeit der Prüforganismen zu überprüfen.

ANMERKUNG Die Erfahrung hat gezeigt, dass Cadmiumchlorid eine geeignete Referenzsubstanz ist.

In regelmäßigen Zeitabständen sind die Werte von $EC_{50,m}$ (28 Tage) und $EC_{50,d}$ (28 Tage) für Cadmiumchlorid durch Anwendung der in der vorliegenden Internationalen Norm beschriebenen Vorschrift zu bestimmen.

WARNUNG — Beim Umgang mit Cadmiumchlorid, das zu den Schadstoffen gehört, sollten entsprechende Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

$EC_{50,m}$ (28 Tage) für $CdCl_2$ muss zwischen 350 mg und 650 mg Cd je kg trockenes Prüfsubstrat liegen.

$EC_{50,d}$ (28 Tage) für $CdCl_2$ muss zwischen 500 mg und 800 mg Cd je kg trockenes Prüfsubstrat liegen.

Die erhaltenen Werte und die Daten, an denen sie erhalten wurden, sind im Prüfbericht anzugeben.

Im Jahr 2000 nahmen vier Laboratorien an einem Ringversuch zu Cadmiumchlorid teil. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angeführt (siehe auch Literaturhinweise [51]).

Tabelle 2 — Ergebnisse des Ringversuchs mit *Helix aspersa aspersa* (Substratkontamination, semistatisches Verfahren)

Substanz	$EC_{50,m}$ (28 Tage) mg Cd/kg		$EC_{50,d}$ (28 Tage) mg Cd/kg	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
$CdCl_2$	500	398 bis 622	600	507 bis 781

11 Berechnungen und Angabe der Ergebnisse

11.1 Berechnungen

Für jede Konzentration ist, sofern vorhanden, die prozentuale Mortalität in der Hauptprüfung zu berechnen.

Am Ende der Prüfung (nach 28 Tagen) (optional: wochenweise) sind die Mittelwerte der Massen und der Gehäusedurchmesser der Schnecken für jeden Behälter und jede Konzentration sowie die zugehörigen Standardabweichungen zu berechnen.

In Anhang D ist ein Beispiel für eine Datentabelle angeführt.

Für jeden Behälter sind der Koeffizient für die Zunahme der Biomasse (bezeichnet als $k_{GC,m}$) und der Koeffizient für die Zunahme des Gehäusedurchmessers (bezeichnet als $k_{GC,d}$) nach Gleichung (1) bzw. (2) zu berechnen.

$$k_{GC,m} = \frac{(\bar{m}_{tn} - \bar{m}_{t0})}{\bar{m}_{t0}} \times 100 \quad (1)$$

Dabei ist

$k_{GC,m}$ der Koeffizient für die Zunahme der Biomasse;

$\bar{m}_{tn}$ die mittlere Masse der Schnecken je Wiederholung zum Zeitpunkt tn , in Gramm (g);

$\bar{m}_{t0}$ die mittlere Masse der Schnecken je Wiederholung zum Zeitpunkt $t0$, in Gramm (g).

$$k_{GC,d} = \frac{(d_{tn} - d_{t0})}{d_{t0}} \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist

$k_{GC,d}$ der Koeffizient für die Zunahme des Gehäusedurchmessers;

d_{tn} der mittlere Gehäusedurchmesser der Schnecken je Wiederholung zum Zeitpunkt tn , in Millimeter (mm);

d_{t0} der mittlere Gehäusedurchmesser der Schnecken je Wiederholung zum Zeitpunkt $t0$, in Millimeter (mm).

Für jede Konzentration ist die mittlere prozentuale Hemmung der Biomassezunahme (bezeichnet als $\bar{p}_{l,m}$) und der Zunahme des Gehäusedurchmessers (bezeichnet als $\bar{p}_{l,d}$) nach Gleichung (3) bzw. (4) zu berechnen.

$$\bar{p}_{l,m} = \frac{(\bar{m}_{0tn} - \bar{m}_{0t0}) - (\bar{m}'_{tn} - \bar{m}'_{t0})}{(\bar{m}_{0tn} - \bar{m}_{0t0})} \times 100 \quad (3)$$

Dabei ist

$\bar{p}_{l,m}$ die mittlere prozentuale Hemmung der Biomassezunahme;

$\bar{m}_{0tn}$ die mittlere Masse der Schnecken in der Kontrolle zum Zeitpunkt tn , in Gramm (g);

$\bar{m}_{0t0}$ die mittlere Masse der Schnecken in der Kontrolle zum Zeitpunkt $t0$, in Gramm (g);

$\bar{m}'_{tn}$ die mittlere Masse der Schnecken je Konzentration zum Zeitpunkt tn , in Gramm (g);

$\bar{m}'_{t0}$ die mittlere Masse der Schnecken je Konzentration zum Zeitpunkt $t0$, in Gramm (g).

$$\bar{p}_{l,d} = \frac{(\bar{d}_{0tn} - \bar{d}_{0t0}) - (\bar{d}'_{tn} - \bar{d}'_{t0})}{(\bar{d}_{0tn} - \bar{d}_{0t0})} \times 100 \quad (4)$$

Dabei ist

$\bar{p}_{l,d}$ die mittlere prozentuale Hemmung der Zunahme des Gehäusedurchmessers;

$\bar{d}_{0tn}$ der mittlere Gehäusedurchmesser in der Kontrolle zum Zeitpunkt tn , in Millimeter (mm);

- $\bar{d}_{0t0}$ der mittlere Gehäusedurchmesser in der Kontrolle zum Zeitpunkt t_0 , in Millimeter (mm);
- $\bar{d}'_{tn}$ der mittlere Gehäusedurchmesser je Konzentration zum Zeitpunkt tn , in Millimeter (mm);
- $\bar{d}'_{t0}$ der mittlere Gehäusedurchmesser je Konzentration zum Zeitpunkt t_0 , in Millimeter (mm).

11.2 Angabe der Ergebnisse

Für jede Konzentration und unterschiedliche Zeitpunkte der Messung ist die prozentuale Mortalität für jede Wiederholung anzugeben und für die Parameter Masse und Gehäusedurchmesser ist Folgendes anzugeben:

- die berechneten Mittelwerte und die Standardabweichung je Wiederholung;
- der Wachstumskoeffizient je Wiederholung (siehe Beispiele in E.1 und E.2);
- die mittlere prozentuale Wachstumshemmung (siehe Beispiele in E.3 und E.4);
- eine graphische Darstellung der Prüfergebnisse, die ein klares Bild der Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich der Wirkungen auf das Wachstum vermittelt.

Es ist (optional) möglich, die LOEC unter Anwendung eines geeigneten multiplen Vergleichs zu bestimmen und daraus die NOEC abzuleiten, die Konzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

Für die Prüfsubstanzen, -zubereitungen oder -matrices, bei denen die Mortalität dosisabhängig ist, sind nach Möglichkeit unter Anwendung eines geeigneten statistischen Verfahrens die LC_{50} (28 Tage) und deren 95%-Vertrauensintervall zu berechnen (das zur Bestimmung der Wachstumshemmung angewendete Verfahren ist geeignet).

Zur Schätzung der Konzentration, die eine Wachstumshemmung von x % verursacht (EC_x , zum Beispiel EC_{10} , EC_{20} oder EC_{50}), ist es möglich, ein Modell an die Prüfergebnisse ($k_{GC,m}$ oder $k_{GC,d}$) anzupassen. Dazu müssen die Werte für EC_x und die Parameter, die dieses Modell beschreiben, nach Möglichkeit mit ihrem Vertrauensintervall (z. B. 95 %) geschätzt werden.

Die Anpassung des Modells an die Daten muss entweder durch Anwendung eines statistischen Tests oder durch eine graphische Darstellung beurteilt werden.

Es ist möglich, das logistische Modell anzuwenden, das generell für die statistische Analyse der erzeugten Daten geeignet ist.

ANMERKUNG 1 Dieses Modell wird im Rahmen der Analyse von Ringversuchsergebnissen angewendet (siehe Abschnitt 10).

Dieses Modell wird durch Gleichung (5) beschrieben:

$$Y = \frac{a}{1 + \left(\frac{C}{EC_{50}}\right)^b} \quad (5)$$

Dabei ist

- Y der Wachstumskoeffizient der lebenden Schnecken je Wiederholung ($k_{GC,m}$ oder $k_{GC,d}$);
- C die zu prüfende Konzentration (Prüfvariable).

Die folgenden Parameter, die das Modell beschreiben, werden aus den erhaltenen Daten geschätzt (z. B. mit der Methode der kleinsten Quadrate).

EC_{50} die Konzentration, die eine Wachstumshemmung von 50 % verursacht;

a der in der Kontrolle erwartete Wachstumskoeffizient der Schnecken;

b der Parameter, der den Anstieg der Kurve beschreibt.

Die EC_x kann dann aus Gleichung (6) geschätzt werden:

$$EC_x = EC_{50} \left(\frac{x}{100 - x} \right)^{\frac{1}{b}} \quad (6)$$

Dabei ist

x die gesuchte wirksame Konzentration zur Berechnung von EC_x (anfänglich festgelegter Parameter).

Andere Modelle können angewendet werden. In diesem Fall muss im Prüfbericht eine Beschreibung des angewendeten Modells angeführt werden. Statistische Verfahren sind zum Beispiel in Literaturhinweis [52] beschrieben.

Bei Substanzen oder Zubereitungen sind die Werte für $EC_{50,m}$ (28 Tage), $EC_{50,d}$ (28 Tage) und, bei Bedarf, NOEC und LOEC in mg Prüfsubstanz oder Zubereitung je Kilogramm Prüfsubstrat (bezogen auf die Trockenmasse) anzugeben.

Bei Böden und Abfällen sind die Werte für $EC_{50,m}$ (28 Tage), $EC_{50,d}$ (28 Tage) und, bei Bedarf, NOEC und LOEC als Massenanteil von Boden oder Abfall in der Prüfmischung in Prozent (bezogen auf die Trockenmasse) anzugeben.

ANMERKUNG 2 Es ist auch möglich (optional), andere Werte von EC_x zu bestimmen (zum Beispiel $x = 10 \%$, 25% usw.). Verschiedene Parameter (EC_x , NOEC, LOEC, LC_{50}) können auch zu anderen Messzeitpunkten (nach 7, 14 oder 21 Tagen) bestimmt werden.

12 Gültigkeit der Prüfergebnisse

Die Ergebnisse werden als gültig angesehen, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- die beobachtete prozentuale Mortalität in den Kontrollbehältern überschreitet am Ende der Prüfung nicht 10 %;
- der für das Wachstum in den Kontrollen berechnete Variationskoeffizient überschreitet nicht 40 %;
- die mittlere Masse der Schnecken in den Kontrollen hat sich im Verlauf der Prüfung mindestens vervierfacht;
- der Gehäusedurchmesser der Schnecken in den Kontrollen hat sich im Verlauf der Prüfung um mindestens das 1,5-Fache erhöht.

ANMERKUNG Wenn andere Spezies als *Helix aspersa* verwendet werden, sind Gültigkeitskriterien aufzustellen.

13 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss eine Verweisung auf diese Internationale Norm und die folgenden Angaben enthalten:

- a) eine Verweisung auf diese Internationale Norm, d. h. ISO 15952;
- b) alle zur Identifizierung der Prüfsubstanz, -zubereitung oder -matrix erforderlichen Daten [insbesondere die Herkunft, die Art der Matrix (falls bekannt) sowie der enthaltenen Kontaminanten (falls sie identifiziert wurden), der pH-Wert, das Wasserrückhaltevermögen und der Wassergehalt der Matrix];
- c) die Vorbehandlung, falls erfolgt, des zu prüfenden Abfalls oder Bodens;
- d) die vollständige Beschreibung des verwendeten biologischen Materials (Arten, Alter, Masse, Gehäusedurchmesser, Anzuchtbedingungen, Aufbewahrungsdauer und Bedingungen vor Beginn der Prüfung, Bezugsquelle, Weckbedingungen);
- e) die Art des verwendeten Futters (Markenname, Herstellungsdatum, Lagerungsbedingungen, Wassergehalt);
- f) das Verfahren zur Herstellung des Prüfsubstrates, der pH-Wert zu Beginn und am Ende der Prüfung für einen Behälter je Konzentration;
- g) Parameter, die den natürlichen Boden beschreiben, wenn dieser als Prüfsubstrat verwendet wurde;
- h) das Verfahren zur Herstellung der Prüfmischungen (unter Angabe des für die in Wasser unlösliche Substanz oder Zubereitung verwendeten Lösemittels);
- i) Bedingungen der Prüfumgebung;
- j) eine Tabelle, in der die für jeden Behälter, für jede Konzentration und für die Kontrolle ermittelte prozentuale Mortalität angegeben ist;
- k) eine Tabelle, in der für jede Konzentration und unterschiedliche Messzeitpunkte Folgendes für die Parameter Masse und Gehäusedurchmesser angegeben ist:
 - 1) die berechneten Mittelwerte und die Standardabweichung je Wiederholung;
 - 2) der Wachstumskoeffizient je Wiederholung;
 - 3) die mittlere prozentuale Wachstumshemmung;
 - 4) eine graphische Darstellung der Prüfergebnisse, die ein klares Bild der Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich der Wirkungen auf das Wachstum vermittelt;
- l) die nach Abschnitt 11 angegebenen Prüfergebnisse, das für die Berechnung der EC₅₀ (28 Tage) und zur Abschätzung des 95 %-Vertrauensintervalls angewendete Verfahren, die NOEC und LOEC, falls bestimmt;
- m) die mit der Referenzsubstanz nach Abschnitt 10 erhaltenen Ergebnisse sowie das Datum, an dem sie erhalten wurden;
- n) eine Beschreibung deutlicher oder pathologischer Symptome oder ausgeprägter Verhaltensänderungen, die bei den geprüften Organismen beobachtet wurden;
- o) alle nicht in diesem Dokument festgelegten Einzelheiten zu Verfahrensschritten sowie alle Faktoren, die möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst haben.

Anhang A (normativ)

Statistisches Verfahren

A.1 Allgemeines

Das statische Verfahren kann als eine mögliche Ergänzung des im Hauptteil des vorliegenden Dokuments beschriebenen semistatischen Verfahrens eingeführt werden.

Die Prüfumgebung, die verwendeten Reagenzien, die Geräte, die Vorbereitung der Proben, die Berechnungen und Angabe der Ergebnisse, die Gültigkeitskriterien, der Prüfbericht sind mit denen, die für das semistatische Verfahren beschrieben wurden, identisch.

ANMERKUNG Das statische Verfahren ist zum Beispiel für Substanzen, Zubereitungen oder Matrices geeignet, die nicht regelmäßig (z. B. wöchentlich) verwendet werden, wie z. B. Pestizide, die in der Saison einmal versprüht werden, oder Schlamm, der einmal im Jahr in den Kulturboden eingebracht wird. Es kann auch bei Substanzen angewendet werden, bei denen geprüft wurde, dass sie unter den Prüfbedingungen stabil sind.

A.2 Durchführung

Es ist auf die gleiche Weise zu verfahren wie bei dem semistatischen Verfahren (siehe Abschnitt 9), mit Ausnahme der Erneuerung der Prüfmischungen. Die Mischungen (9.1.2) werden hergestellt und zu Beginn der Prüfung hinzugefügt, jedoch im Verlauf der 28-tägigen Prüfdauer nicht ausgewechselt.

A.3 Referenzsubstanz

In regelmäßigen Zeitabständen sind die Werte von $EC_{50,m}$ (28 Tage) und $EC_{50,d}$ (28 Tage) für Cadmiumchlorid durch Anwendung der im Hauptteil dieser Internationalen Norm beschriebenen Vorschrift zu bestimmen (10).

$EC_{50,m}$ (28 Tage) für $CdCl_2$ muss zwischen 500 mg und 900 mg Cd je kg trockenes Prüfsubstrat liegen.

$EC_{50,d}$ (28 Tage) für $CdCl_2$ muss zwischen 700 mg und 1 000 mg Cd je kg trockenes Prüfsubstrat liegen.

Die erhaltenen Werte und die Daten, an denen sie erhalten wurden, sind im Prüfbericht anzugeben.

Im Jahr 2000 nahmen vier Laboratorien an einem Ringversuch zu Cadmiumchlorid teil. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.1 angeführt.

**Tabelle A.1 — Ergebnisse des Ringversuchs mit *Helix aspersa aspersa*
(Substratkontamination, statisches Verfahren)**

Substanz	$EC_{50,m}$ (28 Tage) mg Cd/kg		$EC_{50,d}$ (28 Tage) mg Cd/kg	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
$CdCl_2$	650	534 bis 877	863	758 bis etwa 1 000