

DIN EN ISO 24032



ICS 13.080.30

Einsprüche bis 2021-02-11

Entwurf

**Bodenbeschaffenheit –
In-situ-Käfighaltung von Schnecken zur Beurteilung der Bioakkumulation
von chemischen Stoffen (ISO/DIS 24032:2020);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 24032:2020**

Soil quality –

In situ caging of snails to assess bioaccumulation of contaminants (ISO/DIS 24032:2020);
German and English version prEN ISO 24032:2020

Qualité du sol –

Encagement *in situ* d'escargots pour la mesure de la bioaccumulation de contaminants
(ISO/DIS 24032:2020);
Version allemande et anglaise prEN ISO 24032:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-12-11 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 oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 115 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 24032:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 15952:2018 siehe DIN EN ISO 15952:2018-12

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 15952:2018-12, *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*

<i>Titel de:</i>	Bodenbeschaffenheit — <i>In-situ</i> -Käfighaltung von Schnecken zur Beurteilung der Bioakkumulation von chemischen Stoffen (ISO/DIS 24032:2020)
<i>Titel en:</i>	Soil quality — <i>In situ</i> caging of snails to assess bioaccumulation of contaminants (ISO/DIS 24032:2020)
<i>Titel fr:</i>	Qualité du sol — Encagement <i>in situ</i> d'escargots pour la mesure de la bioaccumulation de contaminants (ISO/DIS 24032:2020)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Prüforganismen und Ausrüstung	10
5.1 Biologisches Material	10
5.2 Ausrüstung	10
5.2.1 Mikrokosmos	10
5.2.2 Netz	11
5.2.3 Stäbe	11
5.2.4 Fliesenstücke	11
5.2.5 Holzlagerkiste	11
5.2.6 Kisten für Fasten und Probenahme	11
5.2.7 Messschieber	11
5.2.8 Waage	11
5.2.9 Wasser	11
5.2.10 Futter	11
5.2.11 Kleinmaterial	12
6 Vorbereitung der Organismen auf die Exposition	12
7 Exposition der Prüforganismen	12
7.1 Beginn der Exposition	12
7.2 Ende der Exposition — Aushungern	13
7.3 Probenahme und Vorbereitung nach der Exposition	14
8 Berechnung und Darstellung	14
8.1 Allgemeines	14
8.2 Für Metall(oid)e	14
8.2.1 Schwellenrichtwert	14
8.2.2 Berechnung der Summe des Übertragungsüberschusses von Metall(oid)en: SET-Index	15
8.3 Für andere Chemikalien	15
9 Gültigkeit der Prüfung	15
10 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Expositionsquellen und -pfade von Schnecken gegenüber Kontaminanten im Feld	17
Anhang B (informativ) Hauptschritte des <i>In-situ</i> -Biotests	18
Anhang C (informativ) Anzuchtverfahren für Schnecken	20
C.1 Allgemeines	20
C.2 Umgebungsparameter	21
C.2.1 Lichtzyklus	21

C.2.2	Temperatur	21
C.2.3	Luftfeuchte	22
C.2.4	Futter	22
C.2.5	Dichte der Organismen	22
C.3	Zuchtvorrichtung (siehe Bild C.2)	22
C.3.1	Spezielle Zuchtkäfige für Schnecken (ZKS).....	22
C.3.2	Behälter für die Eiablage	23
C.3.3	Brutbehälter.....	23
C.4	Aufrechterhaltung der Zucht.....	23
C.4.1	Reinigung und Fütterung.....	23
C.4.2	Fortpflanzung	24
C.4.3	Bebrütung/Schlüpfen	24
C.4.4	Aufzucht	24
Anhang D (informativ) Beispiel für die Zusammensetzung von Schneckenfutter		26
Anhang E (informativ) Übliche Konzentrationen in der viszerale Masse von subadulten Schnecken vor der Käfighaltung		27
Anhang F (informativ) Standardisierte Formen empfohlener Prüfsysteme für die <i>In-situ</i> - Exposition zur Bewertung der Bioakkumulation von Kontaminanten in Schnecken		28
Anhang G (informativ) Beispiel für die Masse der Schnecken vor der Exposition.....		32
Anhang H (informativ) Ergebnisse des internationalen Ringversuchs.....		34
H.1	Allgemeines zur <i>In-situ</i> -Exposition.....	34
H.2	Standort und Böden.....	35
H.3	Exposition von Schnecken, Umweltparameter.....	39
H.4	Ergebnisse der <i>In-situ</i> -Exposition	41
H.4.1	Überleben und Massenverlust.....	41
H.4.2	Konzentrationen von Metall(oid)en (ME) und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)	41
H.5	Schlussfolgerungen des Ringversuchs zur <i>In-situ</i> -Käfighaltung von Schnecken	49
H.6	Referenz.....	49
Anhang I (informativ) <i>Ex-situ</i> -Exposition zur Beurteilung der Bioakkumulation von Chemikalien in Schnecken		54
I.1	Kurzbeschreibung.....	54
I.2	Ergebnisse der Laborprüfung zur <i>Ex-situ</i> -Übertragung von ME auf Schnecken	55
I.2.1	Mortalität und Massenänderung	56
I.2.2	<i>Ex-situ</i> -Übertragung von Metall(oid)en auf Schnecken.....	56
I.2.3	<i>Ex-situ</i> -Übertragung von PAK auf Schnecken.....	59
Literaturhinweise.....		61

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 24032:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 24032:2020 wurde von CEN als prEN ISO 24032:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen 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.

Einleitung

Schnecken sind ubiquitäre Boden-Makroinvertebraten, die an der Schnittstelle von Boden, Pflanzen und Luft leben. Diese Landlungenschnecken sind phytophag und saprophag (trophische Ebene der Primärkonsumenten und detritivor). Sie nehmen Vegetation und Boden zu sich und kriechen auf dem Boden, wo sie ihre Eier ablegen. Daher integrieren sie mehrere Kontaminationsquellen und -pfade (siehe Anhang A – Bild A.1). Schnecken nehmen am Austausch mit dem Boden teil und werden von verschiedenen Konsumenten gejagt (Wirbellose: Glühwürmchen, Laufkäferlarven oder Wirbeltiere: Vögel, Kleinsäugetiere wie Spitzmäuse, Igel und Menschen).

Unter den Schneckenspezies wird die Spezies *Cantareus aspersus* O.F. Müller 1774 (Synonyme: *Helix aspersa aspersa* (O.F. Müller, 1774), *Cornu aspersum*; https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/199863/tab/taxo), auch als gefleckte Weinbergschnecke, Gemeine Gartenschnecke, Braune Gartenschnecke, Gartenschnecke, Landschnecke oder in Frankreich unter dem Spitznamen „Petit-Gris“ bekannt, empfohlen. Bei dieser Spezies handelt es sich um Landlungenschnecken aus der Familie der Helicidae, die weltweit stark verbreitet ist (Potts, 1975; Chevallier, 1977). Diese paläarktische Art kann sich an Gebiete mit unterschiedlichen Klimaarten anpassen: mediterranes, gemäßigtes ozeanisches, gemäßigtes mittellkontinentales und sogar tropisches Klima. *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) stammt ursprünglich aus Europa und wurde in alle Teile der Welt eingeschleppt. Mittlerweile ist sie auf allen Kontinenten, mit Ausnahme der Antarktis, zu finden. Andererseits ist die Spezies in einigen Ländern als landwirtschaftlich schädliche Schnecke anerkannt und muss vorsichtig behandelt werden.

Jungtiere von Schnecken werden bereits in ISO 15952 (2018) abgedeckt, die beschreibt, wie toxische Wirkungen von Chemikalien oder kontaminierter Matrix *ex situ*, d. h. unter Laborbedingungen, auf das Überleben und Wachstum von jungen Schnecken (1 g fw) beurteilt werden.

Momentan gibt es keine standardisierten *In-situ*-Biotests, die die Beurteilung der Übertragung von Kontaminanten aus der Umgebung auf Organismen der Bodenfauna im Feld ermöglichen. Obwohl ISO 19204 (2017) (in Bezug auf den TRIAD-Ansatz) die Anwendung von drei kombinierten Beweislinien (Chemie, Ökotoxikologie und Ökologie) empfiehlt und die Bedeutung von Bioindikatoren für Wirkung und Akkumulation als zusätzliche Instrumente für die standortspezifische ökologische Gefährdungseinschätzung hervorhebt, stehen nur wenige Biotests für diesen Zweck zur Verfügung. Wie in Anhang A von ISO 19204 (2017) angegeben, sind somit Messungen von Bioakkumulationen in Pflanzen oder Bodenorganismen nützlich, um:

- die effektive Bioverfügbarkeit von Bodenkontaminanten für Bodenorganismen zu beurteilen;
- die Übertragung in der Nahrungskette und das Risiko einer Sekundärvergiftung von Konsumenten zu erfassen.

In einigen Fällen kann Bioakkumulation zu toxischen Wirkungen führen, was jedoch nicht immer der Fall ist (siehe ISO 17402:2008).

Da eine Zucht möglich ist (siehe Anhang in ISO 15952:2018), können Schnecken mit bekannter biologischer Vergangenheit auf dem Feld verwendet werden, um die Bioverfügbarkeit von in den Lebensräumen (Boden, Pflanzen, Luft) vorhandenen Kontaminanten zu analysieren, indem deren Akkumulation in Individuen gemessen wird, die in Käfigen gehalten und für eine bestimmte Zeitspanne exponiert wurden.

C. aspersus kann entweder im Feld (Gomot-de Vaufleury und Pihan, 2000; Scheifler et al., 2006; Regoli et al., 2006; Gimbert et al., 2008a; Pauget et al., 2013; de Vaufleury et al., 2015; Mariet et al., 2017) oder im Labor (Gimbert et al., 2008b; Pauget et al., 2011, 2012, 2017; Louzon et al., 2020) verwendet werden, um den Verbleib und die Übertragung (d. h. die umweltbedingte Bioverfügbarkeit, ISO 17402) von Chemikalien im Boden zu bewerten. Dieser Bioindikator des Bodens wurde an zahlreichen Feldstandorten (<https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/english/worksheet.php>) angewendet, um den Lebensraum und die Rückhaltefunktion von Böden zu bewerten. Dieser Biotest ermöglicht es, die Bioverfügbarkeit von Chemikalien für Schnecken dank der Messung ihrer Konzentration in deren viszeraler Masse (die hauptsächlich die Verdauungsdrüse und einige andere Organe enthält, wie in Gomot-de Vaufleury und Pihan, 2002, beschrieben) zu bestimmen. Die viszerale Masse ist der Hauptort der Anreicherung von Kontaminanten bei Schnecken.

Diese Norm beschreibt, wie Schnecken 28 Tage *in situ* exponiert werden und wie sie vorbereitet werden, bis eine chemische Analyse zur Beurteilung der Bioakkumulation in ihren Eingeweiden durchgeführt wird. Dieser Biotest bewertet die Übertragung von Kontaminanten aus der Umwelt auf Landschnecken.

Diese Prüfung ist im Feld anwendbar (z. B. kontaminierte Standorte, verbesserte Böden, Böden nach der Sanierung, landwirtschaftliche oder andere betroffene Standorte und Abfallmaterialien), indem Schnecken 28 Tage lang in Käfigen auf dem untersuchten Standort/Boden/Abfall gehalten werden. Schnecken nehmen Chemikalien aus allen terrestrischen Quellen (Boden, Pflanzen, Luft) auf. Nach der Exposition werden die Konzentrationen von Chemikalien in der viszeralen Masse der Schnecken gemessen.

Optional kann das Verfahren im Labor (*ex situ*) verwendet werden, um die Bioakkumulation von Chemikalien von Schnecken zu bewerten, die nur Boden ausgesetzt sind (Anhang I).

Die Ergebnisse eines Ringversuchs, der *in situ* von sechs Laboren zur Bewertung des Expositionsverfahrens und von vier Laboren von der Exposition bis zur chemischen Analyse durchgeführt wurde, sind in Anhang H dargestellt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bewertung der Bioakkumulation von Chemikalien in Schnecken, d. h. Konzentrationen von Metall(oid)en (ME) oder organischen Verbindungen (z. B. PAK und PCB), die sich in ihren Geweben angereichert haben.

In diesem Dokument wird dargelegt, wie Schnecken für die 28-tägige *In-situ*-Käfighaltung vorbereitet werden, wie das *In-situ*-Prüfdesign aussieht und wie die Schnecken bis zur Konservierung und weiteren Analyse gesammelt und vorbereitet werden. Falls eine kinetische Untersuchung der Akkumulation notwendig ist, ist auch eine Probenahme der Schnecken zu verschiedenen Zeitpunkten während der Exposition möglich (Gimbert et al., 2008a; Pauget et al., 2013; Mariet et al., 2017).

Diese Norm schließt analytische Verfahren aus: Vorbereitung (Extraktion und Mineralisierung) der Proben und Quantifizierung von Chemikalien. Diese fallen nicht in den Anwendungsbereich des vorliegenden Dokuments.

Das Verfahren ist auf Böden mit unterschiedlicher Nutzung (landwirtschaftliche, industrielle, Wohn- und Waldböden, vor und nach der Sanierung, auf potenziell kontaminierten Standorten usw.) sowie auf Abfallmaterialien (de Vaufleury, 2015; Bouriou et al., 2015) anwendbar und sollte vorzugsweise auf Böden mit Vegetation und/oder Humusbedeckung angewendet werden.

Das Verfahren ist vorbehaltlich bestimmter Temperaturgrenzen (frostfreier Zeitraum, d. h. hauptsächlich von April bis Oktober in gemäßigttem Klima) anwendbar.

Optional (Anhang A) kann das Verfahren im Labor verwendet werden, um die Akkumulation von Kontaminanten (und optional den SET-Index (en: Sum of Excess of Transfer index) für ME, PAK, PCB) von Schnecken zu bewerten, die nur dem Boden exponiert sind.

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

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:

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

3.1 Käfighaltung
geschlossener Mikrokosmos, der eine Exposition von Schnecken auf verschiedenen Pfaden und durch mehrere Quellen ermöglicht

3.2

Bioakkumulation

Phänomen, durch das sich eine im Medium vorhandene Chemikalie in einem lebenden Organismus anreichert

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieses Phänomen wird beobachtet, wenn die Absorptionsrate die Eliminationsrate des Kontaminants übersteigt.

3.3

inaktive Schnecken

Schnecken ohne Aktivität, im Allgemeinen unter trockenen Bedingungen, wo sie an den Wänden der Kiste, in die sie eingesetzt wurden, kleben (im Allgemeinen nur aufgrund eines einfachen getrockneten Schleimrings)

3.4

Sommerruhe

Schnecken werden unter trockenen Bedingungen bei einer Temperatur von 15 °C bis 20 °C inaktiv gehalten

3.5

Parzelle

charakteristische und repräsentative Teilfläche des Standorts

Anmerkung 1 zum Begriff: Die geographischen Koordinaten jeder Parzelle sollten aufgezeichnet werden.

3.6

Standort

Feld (oder geographische Einheit), an dem die Untersuchung durchgeführt wird und wo die Mikrokosmen platziert werden, um die Bioverfügbarkeit von Kontaminanten für Schnecken zu bewerten

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Standort kann eine oder mehrere Parzellen und Bodennutzungen umfassen, d. h. ein Feld, eine Weide, einen Wald, ein Industriegelände, einen Ablauf.

4 Kurzbeschreibung

Die Schnecken werden 28 Tage in Mikrokosmen am Studienstandort in Käfigen gehalten. Es müssen fünfzehn subadulte $[(5 \pm 1) \text{ g Körpermasse}]$ Gartenschnecken in jeden Mikrokosmos eingesetzt werden. Vom Ende ihrer Anzucht bis zu ihrem Einsetzen auf den Boden können sie in trockenen Holzkisten (runde Holzkisten mit einem Durchmesser von etwa 12 cm und einer Höhe von 4 cm, Bild 1 und Bild B.1) gelagert werden. Sie werden aus der Sommerruhe geweckt, indem sie einige Stunden vor dem Einsetzen in den Mikrokosmos mit Wasser besprüht werden. Dort werden sie sowohl dem Boden als auch den Pflanzen, die am Standort gewachsen sind, und der Umgebungsluft ausgesetzt, damit sie sich unter natürlichen Expositionsbedingungen (Klimagefahren) befinden.

Nach der Exposition werden die gesammelten Schnecken zurück ins Labor gebracht und 48 Stunden ausgehungert. Während des Aushungerns wird der Kot alle 24 Stunden entfernt. Die Schnecken werden dann bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wird der Weichkörper aus dem Schneckengehäuse entfernt; die viszerale Masse und der Fuß (Anhang B, Bild B.1) werden voneinander getrennt und für die chemische Analyse zur Bestimmung der inneren Konzentration der Chemikalien vorbereitet. Die Hauptschritte sind in Anhang B dargestellt.

5 Prüforganismen und Ausrüstung

5.1 Biologisches Material

Bei den Prüforganismen muss es sich um subadulte Schnecken handeln (um eine Massenänderung während des Expositionszeitraums und die nachfolgende Verdünnung der Bioakkumulation durch die Massenzunahme während des Wachstums oder die Übertragung von Verbindungen auf die Eier während der Fortpflanzungsstadien zu vermeiden). Empfohlen wird die Landschnecke *Cantareus aspersus* (Müller, 1774), die 7 bis 12 Wochen alt sein und eine mittlere Frischmasse von (5 ± 1) g (mit einem Minimum/Maximum von 4 g/6 g) haben muss.

ANMERKUNG 1 Optional kann der Gehäusedurchmesser gemessen werden (Mittelwert $\pm$ SD von $25 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$; Min./Max. von 20 mm/30 mm).

Die Schnecken müssen einer synchronen Anzucht entnommen werden, um eine möglichst homogene Population in Bezug auf Masse und Alter zu bilden. Die Anzuchtverfahren für Schnecken sind in Anhang C beschrieben. Kurz gesagt müssen die subadulten Schnecken nach einer Aufzucht- und einer anschließenden Wachstumsphase (3 bis 6 Wochen, gefolgt von 4 bis 6 Wochen) direkt oder nach einer Zeit der Sommerruhe, die nicht länger als 5 Monate dauern sollte (d. h. Schnecke inaktiv, an der Wand einer trockenen Kiste klebend (Kunststoffkisten sind zu vermeiden), in einem temperaturkontrollierten Raum zwischen 15°C und 20°C), verwendet werden. Die Sommerruhe erfolgt in runden Holzkisten (mit einem Durchmesser von etwa 12 cm und einer Höhe von etwa 4 cm); üblicherweise 15 Schnecken je Kiste, was der Anzahl der Schnecken je Mikrokosmos entspricht).

Die Schnecken müssen für die Zwecke des Projekts gezüchtet (siehe Anhang C und Anhang D) oder von lokalen Schneckenzüchtern gekauft werden.

ANMERKUNG 2 Die Verwendung einer anderen Gattung und/oder Art von *Helicidae* ist möglich (siehe Beispiele und Bedingungen in Anhang G von ISO 15952:2018).

Eine Kontrolle der chemischen Qualität der subadulten Schnecken, die für die Käfighaltung ausgewählt wurden (d. h. nicht exponierte Schnecken), kann an 6 Schnecken im Hinblick auf die Ausgangskonzentrationen der zu betrachtenden Chemikalien durchgeführt werden. Diese Kontrollschnecken können gleichzeitig mit den Schnecken, die für die Käfighaltung verwendet werden, ausgewählt werden. Die Analyse der chemischen Qualität der Schnecken vor der Käfighaltung kann gleichzeitig mit der Analyse der Schnecken nach der Exposition durchgeführt werden. Es ist nicht zwingend erforderlich, diese Kontrolle durchzuführen. Tatsächlich werden nach der Exposition alle Daten mit dem Schwellenrichtwert (en: threshold guide value, TGV) verglichen (siehe 8.2); wenn es jedoch möglich ist, diese Daten zu erhalten, zeigt dies, dass die Schnecken vor der Exposition nicht kontaminiert waren. Für Chemikalien, für die kein TGV verfügbar ist, können die Daten mit verschiedenen Werten (siehe 8.2.2.3) verglichen werden, darunter Csnail-t0.

Die verwendeten subadulten Schnecken müssen vor der Käfighaltung übliche Konzentrationen in der viszerale Masse aufweisen (Anhang E). Da die Extraktion häufig an Frischgewebe erfolgt, sind die PAK- und PCB-Daten der Tabelle E.1 in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Frischmasse der Eingeweide angegeben (diese Werte können auf der Grundlage von $\approx 15\%$ Trockenmasse der viszerale Masse in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dw umgerechnet werden); für Metall(oid)e werden sie in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ -Trockenmasse der viszerale Masse angegeben.

5.2 Ausrüstung

5.2.1 Mikrokosmos

Zylinder aus nichtrostendem Stahl mit einem Durchmesser von 25 cm und einer Höhe von 25 cm, die mit einem Netz mit einer Maschenweite von 0,5 cm oder 1 cm abgedeckt sind. Ein Beispiel ist in Bild 1 und in Anhang F dargestellt.

ANMERKUNG 1 Es könnten auch andere Geräte verwendet werden, wenn das Material, aus dem sie bestehen, keine Kontaminationsquelle darstellen kann; für bestimmte Zwecke (z. B. Exposition von Schnecken gegenüber Chemikalien, die im Feld versprüht werden) kann ein vollständig abgeschirmter Mikrokosmos verwendet werden (siehe z. B. Druart et al. (2011), die Käfige aus nichtrostendem Stahl mit den Maßen 25 cm × 25 cm × 15 cm (Maschenweite: 1 cm) verwendeten, verschlossen durch ein Gitter aus nichtrostendem Stahl mit den Maßen 30 cm × 30 cm (Maschenweite: 1 cm), gehalten von vier Stäben (siehe Anhang F, Bild F.2).

ANMERKUNG 2 In einigen Fällen könnte es notwendig sein, den Mikrokosmos vor Raubtieren oder Rindern zu schützen (siehe Beispiele in Anhang F, Bild F.3).

5.2.2 Netz

Netz mit einer Maschenweite von 0,5 cm oder 1 cm, auch aus nichtrostendem Stahl.

5.2.3 Stäbe

Stäbe aus nichtrostendem Stahl (Durchmesser 5 mm; Länge 46 cm bis 72 cm) zur Sicherung des Maschennetzes auf dem Käfig. Je nach der Bodensetzung oder dem Vorhandensein von Steinen muss die Größe des Stabes angepasst werden.

5.2.4 Fliesenstücke

Siehe Bild 1 und Anhang F.

5.2.5 Holzlagerkiste

Inaktive Schnecken können vor der Exposition in runden Holzkisten (mit einem Durchmesser von etwa 12 cm und einer Höhe von etwa 4 cm) gelagert und transportiert werden, wobei die Schnecken unter trockenen Bedingungen bei einer Temperatur von 15 °C bis 20 °C gelagert werden (siehe Bild 1, Bild F.5 und Anhang G).

5.2.6 Kisten für Fasten und Probenahme

Zur Vorbereitung der Schnecken im Labor (z. B. zur Aufbewahrung der Schnecken vor der Einzelwägung) können Kunststoffbehälter (PCs; en: plastic containers) verwendet werden (z. B. Behälter aus transparentem Polystyrol oder jeder sonstige Behälter, der die ungefähren Maße 24 cm (Länge) × 10,5 cm (Breite) × 8 cm (Höhe) hat).

5.2.7 Messschieber

Für die Messung des Gehäusedurchmessers ein Messschieber mit einer Fehlergrenze von 0,1 mm.

5.2.8 Waage

Eine Analysenwaage mit einer Fehlergrenze von höchstens 10 mg.

5.2.9 Wasser

Wasser mit einer Reinheit, die mindestens der von entionisiertem Wasser entspricht.

5.2.10 Futter

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

Um ein hinreichendes Wachstum zu erreichen, wird empfohlen, die Prüfungen mit einem mehlbasierten Futter durchzuführen, das Getreide, Grünfutter, Mineralsalze und Vitamine enthält und die Bedürfnisse der Schnecken ausreichend abdeckt. Ein Beispiel für die Zusammensetzung eines Futters ist in Anhang D angeführt.

5.2.11 Kleinmaterial

Elastische Streifen zum Verschließen der Holzlagerkisten zum Fasten und zur Probennahme. Klebeband zum Beschriften der Holzlagerkisten zum Fasten und zur Probenahme; Permanentmarker; Ziploc®-Beutel.

6 Vorbereitung der Organismen auf die Exposition

Nach dem Ende ihres Wachstums (Bild C.1, Wachstum 1, d. h. die Zeit, die benötigt wird, um Subadulte zu erhalten, die die für die Prüfung erforderliche Masse erreicht haben) müssen Schnecken inaktiv in einer Holzbox (siehe 3.5) gelagert werden. Ihre Masse wird während dieser Lagerungszeit abnehmen, weshalb sie in einigen Fällen (d. h. bei einer Lagerung von mehr als 1 Woche) einige Tage vor Prüfungsbeginn aus der Sommerruhe geweckt werden müssen (siehe Abschnitt 6).

Je nach der Dauer der Lagerung zwischen dem Ende der Wachstumsperiode (d. h. bei Erreichen der geforderten mittleren Masse, siehe 5.1.) und dem Beginn der Prüfung im Feld müssen die Schnecken durch Besprühen mit Wasser in der Box nach folgenden Szenarien aufgeweckt oder nicht aufgeweckt werden.

- Wenn die Schnecken in der Woche nach dem Wägen und Einteilen in homogene Chargen (15 Schnecken für einen Mikrokosmos) verwendet werden, müssen sie lediglich einige Stunden vor der Verwendung im Feld aufgeweckt werden. Dazu müssen sie mit Wasser besprüht werden. Dies erleichtert ihre Handhabung bei der Herausnahme aus der Holzbox und dem Einsetzen in den Mikrokosmos, wenn sie sich im Feld befinden.
- Wurden sie vor der Exposition im Feld über einen längeren Zeitraum (> 1 Woche, aber < 5 Monate) gelagert, sollten sie aufgeweckt und 2 Tage bis 5 Tage mit Schneckenfutter (5.2.10) gefüttert werden, damit sie ihre Anfangsmasse erreichen. Nachdem sie durch Besprühen mit Wasser aufgeweckt wurden, werden sie 2 Tage bis 3 Tage in Käfige oder Kunststoffboxen (siehe Bild C.2 in Anhang C) gesetzt, dann erneut gewägt und in homogenen Chargen (siehe Beispiel in Anhang G, Tabelle G.1, Bild G.1) verteilt, die für eine kurze Lagerung (0 bis 1 Woche) verwendet werden.

Der Anteil der Schnecken, die nicht erwachen, muss unter 20 % liegen. Sobald sie aktiv werden (Schnecken, die nicht mehr an den Wänden der Box haften und beginnen, sich zu bewegen), müssen die Schnecken in eine Box überführt werden, die mit Wasser befeuchtet wurde.

Alle für die Prüfung benötigten Schnecken müssen gewägt und in verschiedene Massenklassen eingeteilt werden (z. B. Gruppierung aller Schnecken von 4 g bis 4,5 g, von 4,6 g bis 5 g, von 5,1 g bis 5,5 g, von 5,6 g bis 6 g). Dann werden Gruppen von je 15 Schnecken vorbereitet, die in Bezug auf die Masse so homogen wie möglich sind (gleiche Verteilung der mittleren Gruppenmasse, siehe Beispiel Anhang G, Bild 1).

ANMERKUNG Optional könnte der Gehäusedurchmesser gemessen werden.

Die Schnecken müssen für die Prüfung einzeln gewägt und in Holzlagerboxen eingesetzt werden; je Holzlagerbox sind 15 Individuen zu lagern, da ein Mikrokosmos 15 Schnecken für die Exposition enthalten muss. Die Gruppe von 15 Schnecken muss in Bezug auf die gesamte Frischmasse so homogen wie möglich sein.

7 Exposition der Prüforganismen

Die Hauptschritte des Biotests sind in Anhang F dargestellt (ein Beispiel für eine Datentabelle ist in Anhang G, Tabelle 1 angegeben).

7.1 Beginn der Exposition

Auf jede Parzelle müssen drei Mikrokosmen platziert werden. Jeder Mikrokosmos sollte 15 Schnecken enthalten, die dem Boden, dem Humus und der Vegetation unter natürlichen klimatischen Bedingungen ausgesetzt sind. Es müssen Fliesenstücke in den Käfig gelegt werden, um den Schnecken einen Unterschlupf und eine Haftfläche zu bieten.

Die Schnecken müssen vorsichtig aus der Holzkiste entnommen werden, ohne dass zu stark gezogen wird, um ein Zerschneiden des Gehäuses zu vermeiden; sie dürfen keinen weißen Schleim (wie weißen Schaum) produzieren, der Zeichen einer falschen Handhabung ist.

ANMERKUNG 1 Die Anzahl der Mikrokosmen je Parzelle kann je nach Anzahl oder Masse des für die Analyse benötigten Schneckenorgans angepasst werden. Um die Heterogenität des Bodens in Bezug auf intrinsische Eigenschaften und Kontaminationsprofile zu berücksichtigen, werden mindestens 3 Mikrokosmen je Parzellenfläche verwendet. Dies ermöglicht auch die Probenahme der Schnecken, wie unter 7.3 beschrieben.

ANMERKUNG 2 Ist am Standort kein Schatten vorhanden, könnte ein Schattennetz über dem Netz angebracht werden, um die Hitze im Käfig zu reduzieren. Anhang F, Bild F.4.

Nach Ankunft auf dem Feld wird ein Mikrokosmos auf dem Boden eingerichtet (Steine werden entfernt, um einen Abstand zwischen Mikrokosmos und Boden zu vermeiden, damit der Mikrokosmos ausreichend im Boden vergraben ist und die Nägel nicht austreten können, wird der Käfig in die oberste Bodenschicht von 0,5 cm bis 1 cm getrieben). Die Schnecken und die Fliesenstücke, die als Unterschlupf dienen, werden eingesetzt (Bild 1). Zum Schluss werden die Mikrokosmen mit dem Netz abgedeckt und das Netz mit den Stäben fixiert. Für diesen Schritt sind etwa 20 min erforderlich.



Bild 1 — In-situ-Exposition: Aktives Biomonitoring mittels Mikrokosmen, in denen Schnecken exponiert sind (von links nach rechts: subadulte Schnecke, Gesamtfrischmasse 4 g bis 6 g; offener Mikrokosmos; Mikrokosmen, die mit einem Netz aus nichtrostendem Stahl abgedeckt sind (Maschenweite: 10 mm), durch 4 Stäbe sicher über die Oberseite des Mikrokosmos gespannt; Mikrokosmen am Standort)

7.2 Ende der Exposition — Aushungern

Alle Schnecken eines Mikrokosmos werden vorsichtig entnommen und zusammengesetzt, z. B. in der Holzkiste, die für die Lagerung der Schnecken vor der Exposition verwendet wurde.

Zurück im Labor müssen die Schnecken gereinigt werden, d. h. gegebenenfalls durch Entfernen von Bodenpartikeln mit einer Bürste und Wasser. Dann müssen die Schnecken zum Aushungern in eine leicht zu reinigende Kunststoffkiste eingesetzt werden (z. B. wie in Bild C.2 dargestellt). Während des Aushungerns müssen die Schnecken zwei Tage aushungern (bis sie keinen Kot mehr produzieren). Während dieser Hungerperiode muss der Kot alle 12 Stunden entfernt werden, um zu vermeiden, dass Schnecken den Kot wieder fressen. Es wird empfohlen, die Schnecken am Ende der Exposition und nach dem Aushungern vor dem Einfrieren zu wägen.

ANMERKUNG 1 Da die Masse durch das Wetter im Feld beeinflusst wird, erleichtern das Wägen der Schnecken nach dem Aushungern und eine homogene Hydratation den Vergleich zwischen Schnecken, die unter ganz unterschiedlichen meteorologischen Bedingungen exponiert waren, oder zwischen Experimenten, die in verschiedenen Jahren durchgeführt wurden. Optional könnte der Gehäusedurchmesser gemessen werden.

Die Schnecken werden dann bei -80°C eingefroren. Sie können in Ziploc®-Beuteln oder jedem sonstigen wirksam verschließbaren Behälter eingefroren werden.

ANMERKUNG 2 Optional kann ein Gefrierschrank mit -20°C verwendet werden, wenn kein Gefrierschrank mit -80°C zur Verfügung steht.

7.3 Probenahme und Vorbereitung nach der Exposition

Für die Vorbereitung der viszeralen Masse müssen die Schnecken aufgetaut werden. Je nach Raumtemperatur wird abgewartet, bis der Weichkörper vollständig weich ist (im Körper darf kein Eis mehr vorhanden sein). Nach dem Auftauen sind die Schnecken zu wägen, der Weichkörper (d. h. Fuß + viszerale Masse) muss aus dem Gehäuse entfernt und die viszerale Masse für die Analyse der Chemikalien vom Fuß getrennt werden (Anhang B, Schritt 3, Bild B.3).

ANMERKUNG 1 Für die Entfernung der viszeralen Masse benötigen ungeübte Wissenschaftler etwa 10 Minuten und geübte Wissenschaftler 2 Minuten.

Es müssen zwei Schnecken je Mikrokosmos nach 28 Tagen Exposition nach dem Zufallsprinzip beprobt werden. Die Gesamtzahl der Schnecken, die für die Metall(oid)-Analyse zu beproben sind, beträgt zwei je Mikrokosmos, was zu einer Gesamtzahl von sechs Individuen je Parzelle führt: drei Mikrokosmen × zwei Schnecken/Mikrokosmos). Die verbleibenden Schnecken (13 Schnecken, falls während der Exposition keine Mortalität auftrat) könnten für weitere Analysen tiefgefroren gelagert werden.

ANMERKUNG 2 Falls die Masse der Eingeweide für eine individuelle Analyse nicht ausreicht, könnten die viszeralen Massen von zwei oder mehr Schnecken für die Analyse organischer Verbindungen gepoolt werden, um die erforderliche Masse der zu analysierenden Probe zu erreichen.

ANMERKUNG 3 Wenn nur ein Mikrokosmos auf einer Parzelle verwendet wird (z. B. in einer Vorstudie), werden 6 Schnecken aus dem Mikrokosmos beprobt.

8 Berechnung und Darstellung

8.1 Allgemeines

Aktuell sind zwei verschiedene Wege möglich: einer für Metall(oid)e, für die Richtwerte verfügbar sind, sowie ein weiterer für andere Chemikalien, für die noch keine Richtwerte verfügbar sind.

8.2 Für Metall(oid)e

8.2.1 Schwellenrichtwert

Für 14 Metall(oid)e wurden Schwellenrichtwerte (en: Threshold Guide Value, TGV; zuvor interne Referenzkonzentrationen (CIR_{ef}) genannt, Pauget et al., 2013, 2015) in Schnecken bestimmt, wobei die Metallkonzentrationen in Schnecken, die an unbelasteten Standorten exponiert wurden ($n = 150$), verwendet wurden (siehe Tabelle 1, Bild 2).

Sie ermöglichen die Berechnung des SET-Index (Summe des Übertragungsüberschusses, en: sum of the excess of transfer), um eine Bewertung der anomalen Übertragung von Metall(oid)en auf Schnecken zu ermöglichen. Kurz gesagt: Die ME-Konzentrationen in Schnecken nach 28-tägiger Exposition am untersuchten Standort werden durch den TGV für jedes ME geteilt, um den Akkumulationsquotienten (AQ) zu berechnen; dann werden die AQ-1 für jedes ME addiert, um den SET-Index zu erhalten.

Tabelle 1 — Schwellenrichtwert (TGV) von Metall(oid)en in den Eingeweiden von Schnecken nach 1-monatiger Exposition an nicht kontaminierten Standorten (Pauget et al., 2015). TGV sind Mediane (siehe Bild 2)

ME	As	Cd	Co	Cu	Cr	Hg	Mo	Ni	Pb	Sb	Sn	Sr	Tl	Zn
TGV <i>in situ</i> (mg kg ⁻¹)	0,307	2,27	6,676	184,7	2,01	0,198	4,428	5,249	12,9	0,076	0,058	125,7	0,259	1 490

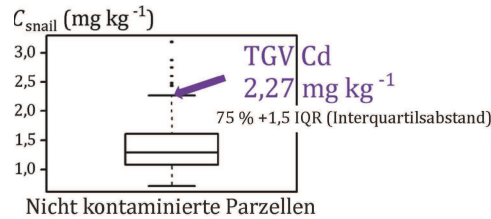


Bild 2 — Beispiel der Berechnung des TGV für Kadmium

8.2.2 Berechnung der Summe des Übertragungsüberschusses von Metall(oid)en: SET-Index

Um die Übertragung von Metallen aus der Umwelt auf Schnecken zu ermitteln, wird die mediane Eingeweidekonzentration der Schnecke mit dem TGV verglichen. Wenn die mediane Konzentration in der Schnecke, die auf der untersuchten Parzelle exponiert war, höher ist als der TGV, dann zeigt der Boden eine anomale Metallübertragung auf Schnecken.

8.2.2.1 Berechnung des Akkumulationsquotienten

$AQ = [C_{snail-28d}] / TGV$ für jedes Metall(oid)

Dabei ist $[C_{snail-28d}]$ = die mediane Konzentration des Metall(oid)s in den Eingeweiden der 6 Schnecken, die auf der untersuchten Parzelle exponiert wurden.

Ist $AQ > 1$, ist damit ein Übertragungsüberschuss nachgewiesen.

8.2.2.2 Berechnung der Summe des Übertragungsüberschusses von Metall(oid)en: SETplot und SETsite

$SET_{plot} = \Sigma(QA-1)$ und

$SET_{site} = \Sigma(QA-1) / n_{plot}$

8.2.2.3 Wenn der TGV für ein untersuchtes Metall(oid) nicht verfügbar ist, kann $C_{snail-28d}$ verglichen werden entweder

- 1) mit $C_{snail-28d}$ der am Kontrollstandort (d. h. nicht kontaminierter Standort) in Käfigen gehaltenen Schnecken
- 2) oder mit $C_{snail-28d}$ der Schnecken, die während der Exposition von Schnecken am Standort im Labor aufgezogen wurden (z. B. wenn es nicht möglich ist, eine Parzelle auf einem nicht kontaminierten Standort zu finden, die als Kontrolle dienen könnte)
- 3) oder zumindest mit $C_{snail-t0}$

8.3 Für andere Chemikalien

Für PAK, PCB, Pestizide oder andere Chemikalien, für die keine *In-situ*-TGV verfügbar sind, muss $C_{snail-28d}$ mit dem in 8.2.2.3 beschriebenen Richtwert verglichen werden.

9 Gültigkeit der Prüfung

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

- die beobachtete prozentuale Mortalität in den Kontrollbehältern überschreitet am Ende der Prüfung nicht 30 %.

10 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss auf diese Internationale Norm verweisen und die folgenden Angaben einschließen:

- a) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO NWIP;
- b) eine Beschreibung des Standorts und der Parzelle(n) des untersuchten Standorts;
- c) Bilder des untersuchten Standorts/der untersuchten Parzellen;
- d) umweltrelevante Informationen (Niederschlag, minimale und maximale gemessene Temperatur oder Temperatur auf der Grundlage einer meteorologischen Station in der Nähe der untersuchten Zone) während der Exposition;
- e) verfügbare Daten über den Boden, den Standort (physikalisch-chemische Daten);
- f) geographische Lage des Mikrokosmos (Postleitzahl, Gemeinde, genaue GPS-Koordinaten (Dezimalgrad oder DMS (Grad, Minuten, Sekunden) und/oder WGS (World Geodetic System)));
- g) Beschreibung der Bedeckung mit Pflanzen und Humus;
- h) Masse der Schnecken (gesamte Frischmasse) zu Beginn der Prüfung (beim Einsetzen in die Holzkiste zum Transport) und nach der Exposition (wie unter Abschnitt 7 angegeben);
- i) Überlebensrate in jedem Mikrokosmos und der Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) für die 3 Mikrokosmen je untersuchter Zone an dem Standort;
- j) eine Beschreibung der deutlichen oder pathologischen Symptome (z. B. Schnecken, die Flüssigkeit produzieren oder einen geschwollenen, glänzenden Fuß zeigen) oder der auffälligen Verhaltensänderungen (z. B. Anzeichen von Lethargie, die bei der Schnecke während der Handhabung nicht nachlassen), die bei den Prüforganismen beobachtet wurden;
- k) jede andere in diesem Dokument nicht spezifizierte Manipulation und alle Ereignisse, die möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Anhang A (informativ)

Expositionsquellen und -pfade von Schnecken gegenüber Kontaminanten im Feld

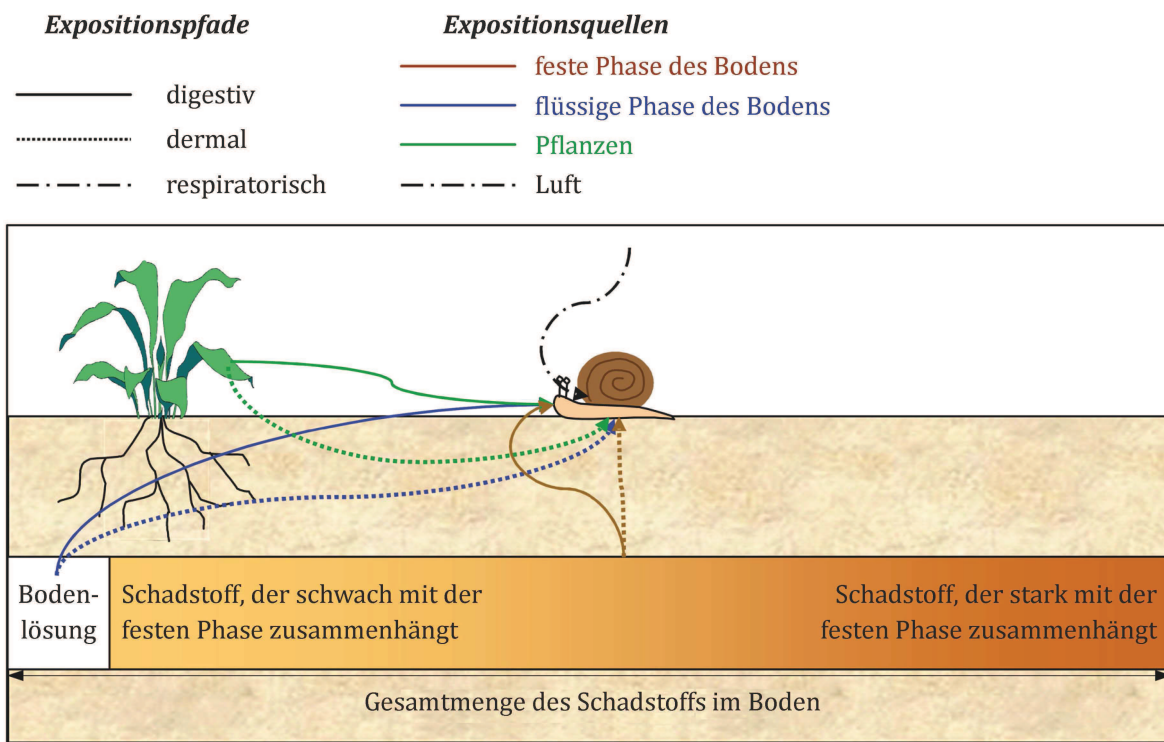


**Bild A.1 — Expositionsquellen und -pfade von Schnecken gegenüber Kontaminanten im Feld
(adaptiert von Scheifler, 2002)**



Bild A.2 — Die Landschnecke *Cantareus aspersus*. Subadult

Anhang B (informativ)

Hauptschritte des *In-situ*-Biotests

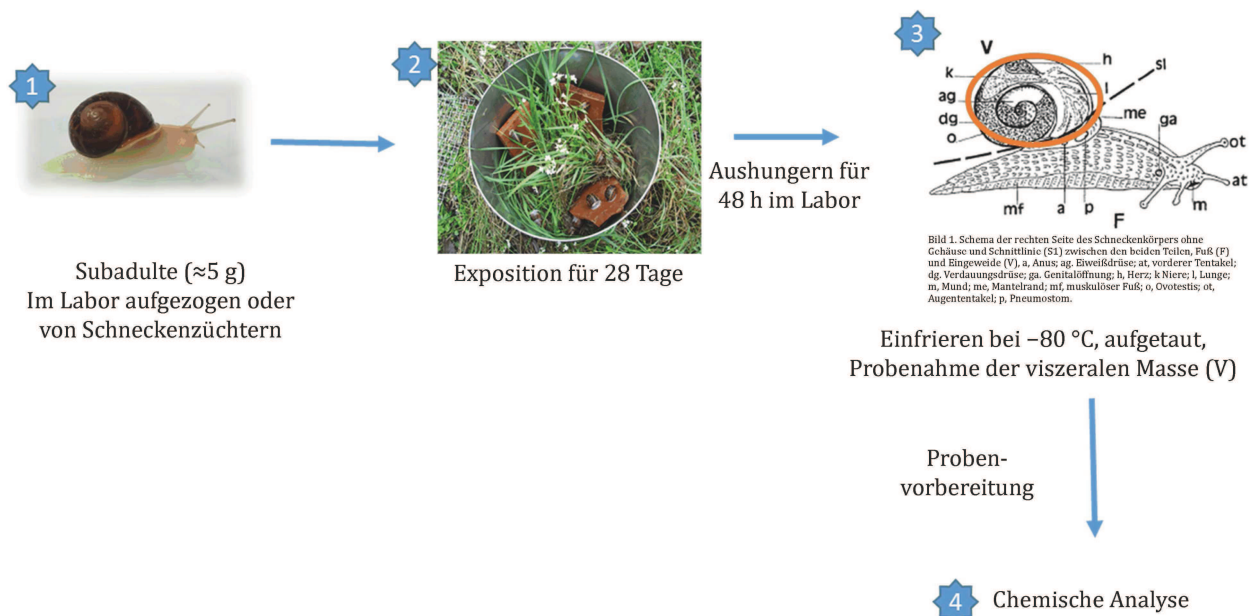


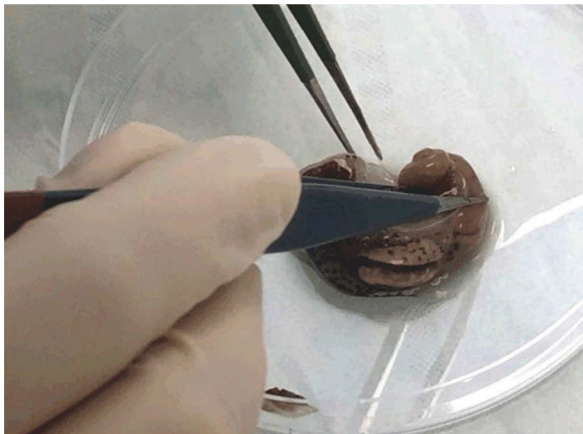
Bild B.1 — Hauptschritte des Biotests. Der rote Kreis in Bild 3 zeigt die viszerale Masse



Bild B.2 — Runder Holzbehälter für Lagerung und Transport der Schnecken (zum Standort und zurück zum Labor)



Entfernung des Weichkörpers aus dem Gehäuse (der weiße Muskel wird an der Basis der Spindel herausgezogen)



Abtrennung der Organe, die die Eingeweide bilden, vom „Fuß“

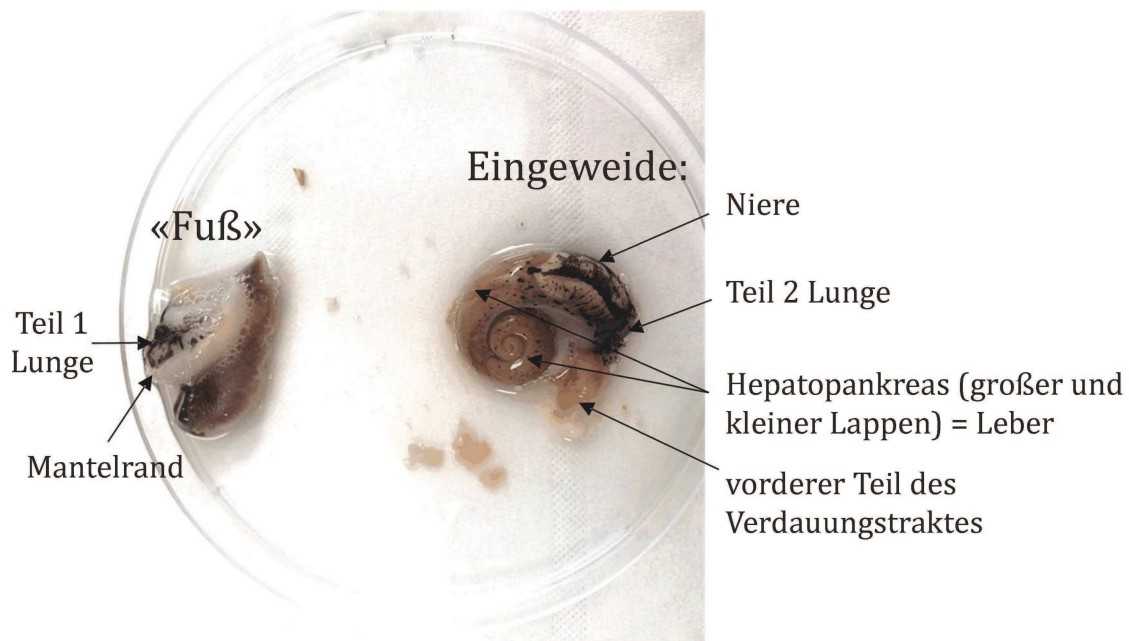


Bild B.3 — Nach dem Auftauen, Vorbereitung der Eingeweide

Anhang C (informativ)

Anzuchtverfahren für Schnecken

C.1 Allgemeines

Die jungen Schnecken, die für Toxizitätsprüfungen verwendet werden, werden durch das so genannte „bodenfreie“ Anzuchtverfahren gewonnen, weil es in einem Gebäude mit einer kontrollierten Umgebung stattfindet, das es ermöglicht, dass das gesamte Jahr über Schnecken zur Verfügung stehen. Die unterschiedlichen Stadien sind in Bild C.1 dargestellt.

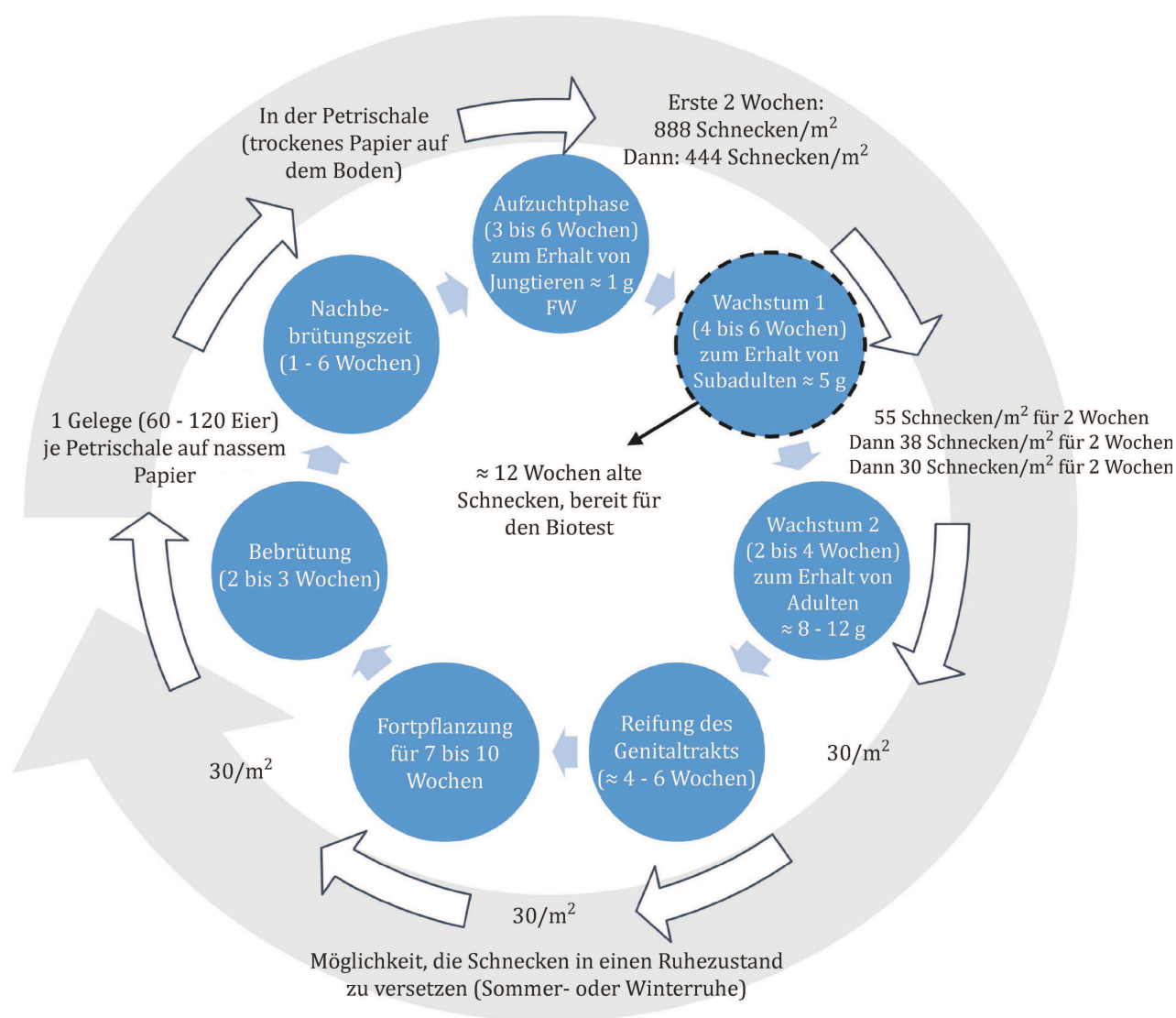


Bild C.1 — Anzuchtzyklus unter kontrollierten Bedingungen: Beispiel für *Cantareus aspersus*

Vom Beginn der Aufzuchtphase an sind drei bis vier Monate erforderlich, um Schnecken zu erhalten, deren Gehäuse eine Lippe aufweisen (der Gehäuserand ist nach außen gewölbt), d. h. die die Adultgröße erreicht haben. Anschließend ist mindestens ein zusätzlicher Monat (d. h. der Reifungsschritt in Bild C.1) erforderlich, bis die Schnecken mit aufgewölbtem Gehäuserand fortpflanzungsfähig sind (vier bis fünf Monate nach dem Beginn der Aufzuchtphase). Diese Zeit entspricht der Reifung des Genitaltrakts. Die Fortpflanzung wird 7 bis 10 Wochen überwacht. Allerdings sind nicht alle Schnecken bereit für eine synchronisierte Eiablage, und dieser Zeitraum ermöglicht es, eine Fortpflanzung von 70 % bis 120 % zu erreichen (die Fortpflanzungsrate ist definiert als das Verhältnis zwischen der Gesamtanzahl erhaltener Eigelege und der Anzahl von Zuchttieren zu Beginn der Fortpflanzungsphase). Subadulte Schnecken, die für die *In-situ*-Käfighaltung verwendet werden, werden nach der ersten Wachstumsperiode (Wachstum 1, Bild C.1) beprobt; die zweite Wachstumsperiode (Wachstum 2, Bild C.1) liefert Schnecken mit aufgewölbtem Gehäuserand (Gimbert et al., 2008b).

Um homogene und synchrone Chargen von jungen Schnecken zu erhalten und um eine kontinuierliche Aufzucht von Schnecken zu vermeiden, ist es möglich, Zuchttiere zu verwenden, die durch ein anderes Anzuchtverfahren gewonnen wurden, dem sogenannten „gemischten“ Verfahren, bei dem die Fortpflanzung und die Bebrütung in Gebäuden erfolgen, das Wachstum jedoch von Mai bis September in Freigehegen erfolgt. Die künftig der Fortpflanzung dienenden Schnecken werden aus diesen Gehegen entnommen und können entweder direkt zur Fortpflanzung eingesetzt werden (wenn sie frühzeitig entnommen werden, bevor sich die natürliche Photoperiode verkürzt, d. h. vor dem 15. August) oder nach einer Winterruhe von mindestens 5 Monaten (wenn sie von Anfang September bis Mitte Oktober entnommen wurden) bei einer Temperatur von 5 °C bis 7 °C.

In jedem der Stadien des biologischen Zyklus der Schnecken ist es möglich, sie durch Entzug von Feuchtigkeit in einen Ruhezustand (Ruhephase) zu überführen. Diese Zeiträume können bei 5 °C bis 7 °C von einigen Monaten (ein bis drei Monate) bei jungen Schnecken bis zu einem Jahr bei adulten Tieren dauern. Für kurze Zeiträume (bis zu 5 Monaten) ist es möglich, die Schnecken unter trockenen Bedingungen bei einer Umgebungstemperatur von 15 °C bis 20 °C in Sommerruhe zu belassen. Für eine längere Dauer des Ruhezustands wird empfohlen, Schnecken in den Winterschlaf zu versetzen.

Diese Verfahrensweise kann für die Anzucht von verschiedenen Lungenschnecken verwendet werden.

Die bei Laborprüfungen zur Toxizität hauptsächlich verwendete Art ist derzeit *Cantareus aspersus* Müller (syn. *Helix aspersa aspersa* oder *Cornu aspersum* (braune Gartenschnecke, Petit-Gris), deren Adultmasse 8 g bis 12 g beträgt.

C.2 Umgebungsparameter

C.2.1 Lichtzyklus

Fortpflanzung, Bebrütung, Aufzuchtphase und Wachstum erfolgen bei einer langen Photoperiode von 18 h Licht und 6 h Dunkelheit. Künstliches Licht wird durch Tageslicht-Leuchtstoffröhren gestellt [Farbwiedergabe-Index von 85 und Hellempfindlichkeitsgrad von 90 (Quotient aus dem Lichtstrom in Lumen und der Strahlungsleistung (Stromverbrauch) in Watt)]. Unabhängig von der Leistung der Lichtquelle sind 10 W/m² bis 15 W/m² erforderlich. Die in den Anzuchtvorrichtungen gemessene Lichtstärke beträgt 50 lx bis 100 lx.

C.2.2 Temperatur

Alle Zuchtphasen werden bei (20 ± 2) °C durchgeführt.

C.2.3 Luftfeuchte

Die relative Luftfeuchte beträgt 80 % bis 95 %.

Wenn Einwegbehälter aus Kunststoff (PCs) verwendet werden, wird die Feuchte durch Befeuchtung des saugfähigen Papiers sichergestellt, das auf den Boden der Behälter gelegt wird. Während der Bebrütung werden die Brutbehälter in einen Raum ohne Luftbefeuchtungssystem gestellt.

Wenn spezielle Zuchtkäfige für Schnecken eingesetzt werden, stellt ein Luftbefeuchter das Befeuchten der Räumlichkeiten sicher, in denen sich die Käfige befinden (eine Befeuchtungsvorrichtung für etwa 150 m³).

C.2.4 Futter

Während der Aufzuchtphase (entspricht den ersten drei Wochen bis fünf Wochen der Zucht), der Wachstums- und Reproduktionsphase wird bestimmtes Futter verwendet (Mehl für Schnecken, siehe Anhang D).

ANMERKUNG Bei angepasstem Futter muss die Masse der Schnecken von 0,03 g zum Zeitpunkt des Schlüpfens auf 1 g nach 3 bis 5 Wochen Aufzucht (Bild C.1) zunehmen.

C.2.5 Dichte der Organismen

Für die Fortpflanzung in Käfigen [siehe Bild C.2 f)] werden 45 Zuchttiere für drei miteinander verbundene Käfige und eine ungefähre Anzahl von 30 Schnecken/m² verwendet.

Für die Fortpflanzung in Einweg-Kunststoffbehältern (PCs) [siehe Bild C.2 a) bis Bild C.2 e)] werden vier Zuchttiere je Doppelbehälter, entspricht 30 Schnecken/m², verwendet.

Für das Wachstum in Käfigen werden 50 junge Schnecken nach der Aufzuchtphase je Käfig, entspricht 100 Schnecken/m², verwendet.

Für das Wachstum in PCs (z. B. Einweg-Mäusekäfigen) werden:

- während der ersten beiden Wachstumswochen fünf junge Schnecken (nach der Aufzuchtphase) je Behälter (ein Behälter und ein flacher Deckel), entspricht 55 Schnecken/m², verwendet;
- während der folgenden zwei Wachstumswochen fünf Schnecken je Doppelbehälter (zwei Behälter, einer davon umgedreht auf dem anderen), entspricht 38 Schnecken/m², verwendet;
- vier Schnecken je Doppelbehälter im Alter von 8 Wochen bis 16 Wochen, entspricht 30 Schnecken/m², verwendet.

Für die Aufzuchtphase in PCs werden während der ersten beiden Wochen 80 ausgeschlüpfte junge Schnecken je Behälter (ein Behälter und ein Deckel) verwendet, entspricht 888 geschlüpften Jungtieren/m². Während der nächsten drei bis vier Wochen wird ein umgedrehter Behälter als Deckel angebracht (entspricht 444 Schnecken/m²) (zwei bis drei Sortiervorgänge nach drei, vier und fünf Wochen).

Zur Erläuterung der Sortierung siehe C.4.4.

C.3 Zuchtvorrichtung (siehe Bild C.2)

C.3.1 Spezielle Zuchtkäfige für Schnecken (ZKS)

Die Zuchtkäfige bestehen aus grauem, lebensmittelechtem Polyvinylchlorid. Die Tür besteht aus transparentem Polycarbonat (Bild C.2 f)).

Diese Vorrichtung kann für die drei Zuchtstadien verwendet werden: Aufzucht, Wachstum und Fortpflanzung.

Ein Käfig hat eine Kontaktfläche von etwa 0,5 m² und ein Volumen von 0,02 m³. Diese Käfige können mit einer Drehachse ausgerüstet sein, die durch eine Reihe von 6 oder 12 Käfigen hindurchgeht; sie ist mit Sprühdüsen mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,3 l/min ausgestattet (bei einer Reihe von 24 Käfigen werden alle zusammen gereinigt). In diesem Fall werden die Käfige als „teilweise selbstreinigend“ bezeichnet, da manuell eine zusätzliche Reinigung mit einem Wasserstrahl erfolgt, nachdem das Düsensprühsystem 2 min bis 5 min (in Abhängigkeit von der Größe der Schnecken) betrieben wurde. Dieses Düsensprühsystem für Käfige ist optional. Die Reinigung kann auch manuell mit einem Wasserstrahl erfolgen. Die Käfige derselben Reihe können miteinander in Verbindung stehen, in Abhängigkeit davon, ob Wachstum oder Fortpflanzung erfolgen sollen. Für die Fortpflanzung sind drei Käfige miteinander verbunden; im mittleren Käfig wird das Sprühen unterbunden und ein Behälter für die Eiablage (durchsichtige Kunststoffkiste aus Polystyrol) eingesetzt.

C.3.2 Behälter für die Eiablage

Wenn die Fortpflanzung direkt in PCs erfolgt (zwei Behälter, einer davon umgedreht auf dem anderen), werden mit Kompost gefüllte Gefäße für die Eiablage auf den Boden der unteren Kiste gestellt. Diese Gefäße bestehen aus Glas (Volumen 140 cm³ bis 180 cm³). Zum Einsammeln der gelegten Eier wird das Glasgefäß umgedreht und die Eier werden mit einem Löffel aufgenommen.

Wenn die Fortpflanzung in Käfigen (ZKS) erfolgt (C.3.1), werden durchsichtige Kunststoffkisten (PCs) aus Polystyrol (2.6) mit einem Volumen von 1 600 cm³ verwendet, die mit Kompost (nicht kontaminierter Universal-Gartenkompost) gefüllt sind. Es können auch Glasgefäße (dieselben wie die, die verwendet werden, um die Eigelege mit den reproduktionsfähigen Tieren in PCs aufzunehmen) verwendet werden.

C.3.3 Brutbehälter

Zur gemeinsamen Bebrütung mehrerer Gelege wird ein im Gartenbau verwendeter Behälter (Ungefährmaße 34,5 cm × 21 cm × 5 cm), verschlossen mit einem Kunststoffdeckel mit Lüftungslöchern, verwendet. Auf den Boden des Behälters wird ein vorab leicht befeuchtetes saugfähiges Papier gelegt, um ein Austrocknen der Eier zu verhindern. In einen Behälter werden maximal 18 bis 25 Eigelege eingebracht, d. h. 90 g bis 150 g Eier.

Zur Bebrütung von einzelnen Gelegen werden Petrischalen (Durchmesser 90 mm × Höhe 15 mm) verwendet. Je Petrischale wird, immer auf ein befeuchtetes saugfähiges Papier, ein Eigelege (d. h. 60 bis 120 Eier) eingebracht. Die Eier werden auf dem Papier verteilt, damit der Deckel gegebenenfalls aufgelegt werden kann, ohne die Eier zu zerstören.

C.4 Aufrechterhaltung der Zucht

C.4.1 Reinigung und Fütterung

Die ZKS (C.3.1) bzw. PCs (2.6) werden dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch und Freitag) gereinigt. Es ist wichtig, die Behandlung zu festen Zeiten und in regelmäßigen Zeitabständen durchzuführen, weil sich die Schnecken an den Aktivitäts- und Fütterungsrhythmus gewöhnen. Die Nichteinhaltung dieser einfachen Regel kann den Zuchterfolg gefährden.

Bei Käfigen, die mit einem automatischen Sprühsystem ausgestattet sind, wird in Abhängigkeit von Alter und Größe der Schnecken für 1 min bis 5 min gesprüht. Anschließend wird eine zusätzliche manuelle Reinigung mit einem Wasserstrahl durchgeführt. Die Käfige werden etwa 15 min bis 30 min abtropfen und trocknen gelassen, anschließend wird das Futter auf den Boden der Käfige gegeben.

Bei PCs (2.6) wird nach dem Reinigen der Behälterwände ein sauberes saugfähiges Papier auf dem Boden angeordnet und befeuchtet. Anschließend wird eine Petrischale mit frischem Futter in den Behälter gestellt.

C.4.2 Fortpflanzung

In ZKS werden für die Dauer von höchstens einer Woche Behälter für die Eiablage (C.3.2) eingesetzt. Beim Herausnehmen aus den Käfigen werden die Behälter für die Eiablage mit einem Mäusekäfig abgedeckt, um die Schnecken zu sammeln, die sich noch in der Eiablagestellung befinden und die anschließend zurück in ihren ursprünglichen Zuchtkäfig gesetzt werden. Die Eigelege werden aufgesammelt und in den Brutbehälter gegeben.

Bei den PCs wird auf die gleiche Weise verfahren, als Behälter für die Eiablage werden jedoch Glasgefäße verwendet.

C.4.3 Bebrütung/Schlüpfen

Während dieses Zeitraumes sollte der Feuchtegehalt der Behälter (B.3.3) überwacht werden und es sollte sichergestellt werden, dass das saugfähige Papier weder zu trocken (die Eier trocknen aus) noch zu feucht ist (die Eier platzen auf und/oder schimmeln).

C.4.4 Aufzucht

Die Schlupfphase beginnt 12 d bis 20 d nach der Eiablage. Die frisch geschlüpften Schnecken verbleiben zunächst dicht beieinander auf dem Boden des Behälters. Anschließend, nach einigen Tagen, beginnen sie, in Richtung Deckel zu wandern. Während dieser Wanderung fressen sie das Papier, das als Brutsubstrat dient. Einige Tage nach dieser Wanderung (6 d bis 15 d) sind die frisch geschlüpften Schnecken stärker pigmentiert und können in die erste Zucht- oder „Aufzucht“-Phase „starten“. In diesem Stadium beträgt die mittlere Masse von *C. aspersus* 25 mg bis 40 mg (während sie zum Beispiel bei *Helix aspersa maxima*, einer anderen Unterart, die hinsichtlich der Schneckenzucht gut angepasst ist, 25 mg bis 50 mg beträgt).

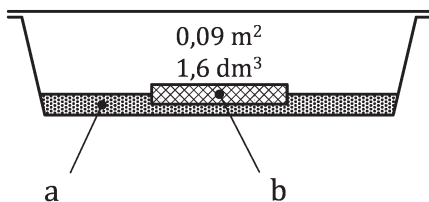
Die Aufzuchtphase wird in PCs durchgeführt [888 Schnecken/m², dann 444 Schnecken/m², Bild C.1 und Bild C.2 a) bis e)]; nach drei bis sechs Wochen Anzucht werden Schnecken, die 0,8 g - 1,3 g erreichen, für den nächsten Wachstumsschritt selektiert.

Hinsichtlich der Umgebungsparameter siehe C.2.

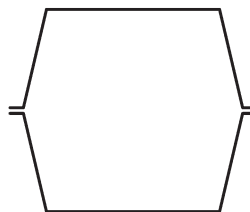
Während der Aufzuchtphase werden die Schnecken mit einer mittleren Masse von 0,8 g bis 1,3 g ausgelesen, um eine möglichst homogene Population zu erhalten, entweder zur Durchführung von Toxizitätsprüfungen an Schnecken, die etwa einen Monat alt sind (für ISO 15952) (ein erster Sortiervorgang wird im Allgemeinen nach drei Wochen Anzucht durchgeführt; die nächsten Sortiervorgänge erfolgen bis sechs Wochen), oder zur Fortsetzung des Wachstums (Wachstum 1 und 2, Bild C.1). Dieser Sortiervorgang ist notwendig, weil die Population am Ende der Aufzuchtphase verhältnismäßig heterogen ist; im Durchschnitt bleiben 10 % bis 30 % der aus einem Eigelege stammenden Schnecken „Zwerge“ und werden nicht für den weiteren Verlauf des Zuchtprozesses beibehalten.



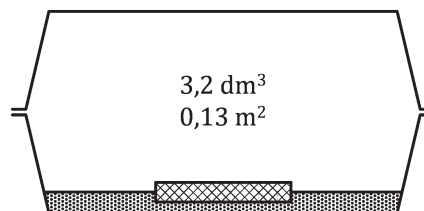
a) Durchsichtige Einweg-Kunststoffkiste — Vorderansicht^a



b) Durchsichtige Einweg-Kunststoffkiste — Seitenansicht^a



c) Durchsichtige Einweg-Kunststoffkiste — Vorderansicht^b



d) Durchsichtige Einwegkiste aus Polystyrol — Seitenansicht^b



e) Durchsichtige Einweg-Kunststoffkiste — Photographie^c



f) ZKS, spezieller Zuchtkäfig für Schnecken — Photographie

Legende

- a Boden (oder feuchtes saugfähiges Papier)
- b Petrischale mit Futter
- a In Bild C.2 a) und Bild C.2 b) ist der Deckel aus transparentem Plexiglas mit zwei Gummibändern befestigt (Wochen 1 und 2 der Prüfung). Das Volumen beträgt 116 m³.
- b In Bild C.2 c) und Bild C.2 d) wurde der flache Deckel durch eine weitere Kiste ersetzt, die umgekehrt aufgesetzt wurde (Wochen 3 und 4 der Prüfung). Das Volumen beträgt 3,2 dm³.
- c Photographie einer Kunststoffkiste, die 5 Schnecken für die Prüfung enthält. Der Deckel ist mit zwei Gummibändern befestigt.

Bild C.2 — Durchsichtige Einweg-Kunststoffkiste und ZKS, spezielle Zuchtkäfige für Schnecken

Anhang D (informativ)

Beispiel für die Zusammensetzung von Schneckenfutter

Die Hauptbestandteile von Schneckenfutter sind zum Beispiel Weizen, „wheat remoulding“, Sojakuchenschrot, Mais, Presskuchenfutter aus Sonnenblumenextrakt, Ölrapsfutter, Mais, „corn distillery drills“, CaCO_3 , Lysin, Methionin, Vitamine (A, D3, E), Spurenelemente (Cu, Fe, Mn, Zn, I, Se). Analytische Hauptbestandteile sind (g/100 g):

- Proteine 15;
- Rohfett 2 bis 2,5;
- Gesamtcellulose 2,5 bis 4;
- Gesamtasche 37;
- Ca 12 bis 13.

Anhang E (informativ)

Übliche Konzentrationen in der viszerale Masse von subadulten Schnecken vor der Käfighaltung

Tabelle E.1 — Übliche Konzentrationen in der viszerale Masse von subadulten Schnecken vor der Käfighaltung. Für Metalle und Metalloide sind die Werte in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Trockenmasse der Eingeweide angegeben. * Für PAK und PCB sind die Daten in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Frischmasse angegeben und entsprechen unserer derzeitigen Bestimmungsgrenze (LD *3).

	Metall(oid)e – Median $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dm (viszerale Masse)																	
Forschungsprogramm	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Sn	Sr	Tl	Zn	133Cs	238U
µscope 2015	0,172	0,706	1,240	1,250	78,6	0,082		2,11	4,570	0,367	0,036		0,015	29,3	0,064	550	0,074	0,49
µscope 2016	0,067	1,361	0,279	0,060	129,3	0,025		1,22	0,517	0,407	0,029		0,123	44,2	0,006	393	0,009	0,039
	0,127	1,53	1,19	0,825	52,3	0,017	256	2,59	4,24	0,510	0,043	1,57	0,032	28,0	0,022	512		
	PAK - Mittelwert $\pm$ SD - $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ fm (viszerale Masse)																	
Combine	ACE ^a	ACY ^a	ANT ^a	BaANT ^a	BaPYR ^a	BbFLT ^a	BghiPL ^a	BkFLT ^a	CHY	dBahANT ^a	FLT	FLU ^a	IcdPYR ^a	NAP	PHE	PYR		
2018	< 13,7	< 16,9	< 9,63	< 1,44	< 6,45	< 2,28	< 5,31	< 2,01	3,99	< 4,08	6,27	< 6,45	< 5,25	21	6,88	8,72		
									1,18		2,96			6,1	5,95	5,03		
	PCB $\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ fm (viszerale Masse)																	
	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180											
	< 0,120	< 0,180	< 0,180	< 0,240	< 0,510	< 0,360	< 0,230											
^a Werte, die der aktuellen Quantifizierungsgrenze unseres Labors entsprechen (= Nachweisgrenze $\times$ 3).																		

Anhang F (informativ)

Standardisierte Formen empfohlener Prüfsysteme für die *In-situ*-Exposition zur Bewertung der Bioakkumulation von Kontaminanten in Schnecken



Bild F.1 — Mikrokosmen (Zylinder), abgedeckt mit Netzen, die von Stäben gehalten werden



Bild F.2 — „Offene“ Mikrokosmen, abgedeckt mit Netzen, die von Stäben gehalten werden
(Druart et al, 2011)



Bild F.3 — Beispiel einer Schneckenkäfighaltung im Wald (mit Holzstäben um den Mikrokosmos herum, um den Mikrokosmos besser sehen zu können), auf einem bewirtschafteten Feld, auf einer Wiese (die Holzvorrichtung um den Mikrokosmos herum soll verhindern, dass Rinder den Käfig umwerfen)

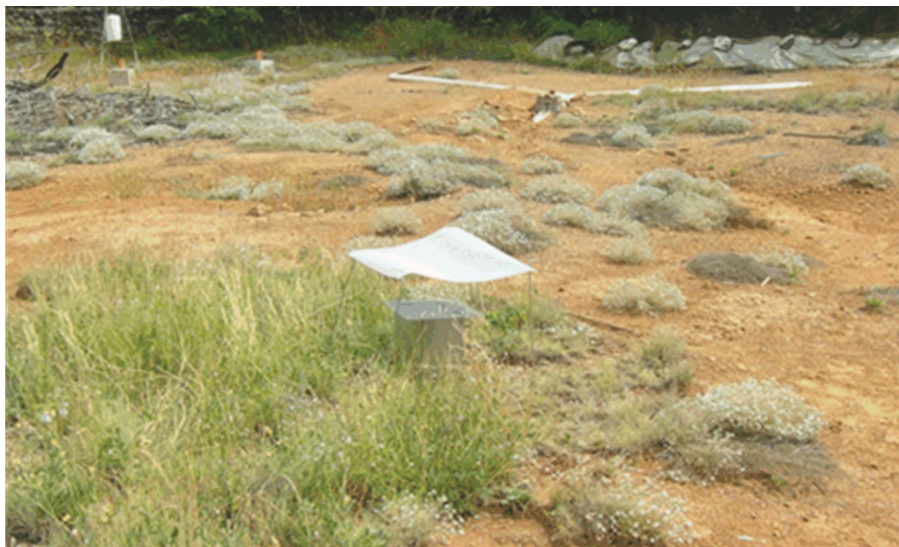


Bild F.4 — Beispiel eines zusätzlichen Schattentuchs





Bild F.5 — Beginn (1) und Ende der Exposition (2) von Schnecken im Feld

Anhang G (informativ)

Beispiel für die Masse der Schnecken vor der Exposition

Tabelle G.1 — Beispiel für eine Datentabelle: Masse der Schnecken vor der Exposition (Mic.: Mikrokosmos)

Masse der Schnecken																	
Mic n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Mittelwert	SD
A1	5,3	5,4	4,6	5,5	5,5	5	4,9	5	4,9	5	4,9	4,9	5,3	4,9	5,8	5,1	0,3
A2	5,2	5,2	4,4	5,6	5,5	5,4	5,1	5	4,9	4,7	5	4,8	5,6	5	6	5,2	0,4
A3	5	5,6	4,8	5,6	5,5	5,3	5,2	5,3	4,8	4,9	4,9	4,8	5,6	4,7	6,2	5,2	0,4
A4	5,2	5,2	4,5	6,1	5,5	5	5,5	5,3	4,7	4,9	5	5	5,7	4,6	6,1	5,2	0,5
B1	4,8	5,7	4,3	5,8	5,6	5,4	4,9	5	4,6	4,9	5	4,6	5,3	4,7	6	5,1	0,5
B2	5,1	5,6	4,6	6	5,7	5,1	5,3	5,2	4,7	4,8	5,2	4,5	5,1	5,1	6,1	5,2	0,5
B3	5,3	5,4	4,7	6	5,7	4,9	5,6	5,2	4,9	5	5,3	4,9	5,5	4,9	6,2	5,3	0,4
B4	5	5,7	4,6	5,7	5,8	5	5,2	5,2	5,1	5	5,4	4,5	5,5	4,8	5,8	5,2	0,4
C1	5,2	5,6	4,4	5,9	5,6	5,2	5,8	5,8	4,7	4,9	5,2	4,6	5,4	4,6	6,2	5,3	0,5
C2	5	5,6	4,4	6,1	5,7	5,2	5,1	5,1	5,4	5	5	4,5	5,5	4,6	6,1	5,2	0,5
C3	4,8	5,2	4,8	5,8	5,7	5,2	5	5,5	5	5,1	5,2	4,6	5,7	4,4	5,9	5,2	0,5
C4	5	5,8	4,7	5,7	5,6	5,3	5,2	5,2	5	4,8	4,8	4,6	5,6	4,8	5,8	5,2	0,4
D1	4,9	5,5	4,6	5,8	5,8	5	5,6	5,3	4,9	4,9	4,9	4,7	5,5	4,5	6	5,2	0,5
D2	5	5,4	4,5	5,9	5,7	5	5,1	5,2	5,5	5,1	5,3	4,6	5,5	4,5	6	5,2	0,5
D3	5,3	5,4	5,3	5,9	5,9	5,1	5,7	5,4	4,8	5,5	4,9	4,7	5,5	4,5	5,9	5,3	0,4
D4	4,9	5,5	5	6,2	5,9	5,2	5,9	5,4	5,1	5,2	4,9	4,5	5,5	4,5	5,9	5,3	0,5
E1	5,1	5,5	4,2	6	5,6	5,1	5	5,8	5	5,4	5	5	5,4	4,6	6,1	5,3	0,5
E2	5,1	5,5	4,3	5,7	5,6	5,2	5,3	5,3	5,3	5,4	5,2	4,7	5,7	4,5	6	5,3	0,5
E3	5	5	5,3	6,1	5,8	5,1	5,2	5,5	5,4	5,4	5	4,6	5,6	4,5	5,8	5,3	0,4
E4	5,1	5	5,2	5,8	5,6		5,6	5,5	5,2	5,3	5,4	4,6	5,4	4,6	5,8	5,3	0,4



Bild G.1— Verteilung der subadulten Schnecken in homogenen Chargen