DIN EN ISO 19040-3:2023-12 (D)

Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser - Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (ISO 19040-3:2018); Deutsche Fassung EN ISO 19040-3:2022

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 9

Vorwort ... 10

1 Anwendungsbereich ... 11

2 Normative Verweisungen ... 11

3 Begriffe ... 11

4 Störungen ... 14

5 Grundlage des Verfahrens ... 14

6 Geräte und Materialien ... 15

7 Reagenzien, Zellen und Medien ... 16

8 Probenahme und Proben ... 19
8.1 Allgemeines ... 19
8.2 Flaschen und Materialien für die Probenahme ... 19
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme ... 20
8.4 Probenahmeverfahren ... 20
8.5 Probentransport ... 20
8.6 Vorbehandlung der Probe ... 20
8.7 Lagerung der Proben ... 21

9 Testverfahren ... 21
9.1 Erhaltung der Zellkultur ... 21
9.1.1 Einfrieren der Zellen ... 21
9.1.2 Ansetzen einer neuen Zellkultur ... 21
9.1.3 Kultivierung der Zellen ... 21
9.2 Reportergen-Testverfahren mit humanen Zellen ... 22
9.2.1 Einsaat der Zellen (Tag 1) ... 22
9.2.2 Herstellung der E2-Referenz (Tag 2) ... 22
9.2.3 Herstellung der Probenverdünnungen (Tag 2) ... 23
9.2.4 Feldblindwert ... 24
9.2.5 Exposition der Zellen (Tag 2) ... 24
9.2.6 Ernten der Zellen (Tag 3) ... 24
9.2.7 Messung der Lumineszenz (Tag 3) ... 24
9.3 Datenauswertung ... 25
9.3.1 Berechnung der Reportergeninduktion ... 25
9.3.2 Berechnung des Prozentsatzes der maximalen Wirkung ... 25
9.3.3 Berechnung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung ... 26

10 Gültigkeitskriterien ... 26
10.1 Gültigkeitskriterien für den Test ... 26
10.2 Gültigkeitskriterien für die Proben ... 26

11 Bewertungskriterien ... 27

12 Untersuchungsbericht ... 27

Anhang A (informativ) Konfiguration des Luminometers **28**

Anhang B (informativ) Testplattenbelegung **29**

Anhang C (informativ) Eigenschaften und Einzelheiten des Biotests **30**

Anhang D (informativ) Testung von Chemikalien und Extrakten **32**
D.1 Allgemeines **32**
D.2 Extraktion von Wasserproben **32**
D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten **32**
D.4 Daten aus der Literatur **32**

Anhang E (informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen **34**

Anhang F (informativ) Verfahrenskenndaten **35**
F.1 Beschreibung des Ringversuchs **35**
F.1.1 Allgemeines **35**
F.1.2 Beschreibung der Proben und teilnehmende Laboratorien **35**
F.1.3 Zusammenfassung der 17β-Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ) **36**
F.1.4 Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen LID (G-Wert) **40**
F.1.5 Richtigkeit der Ergebnisse **44**

Anhang G (informativ) Statistische Bewertung **48**

Anhang H (informativ) Berechnung von 17β-Estradiol-Äquivalenten **49**
H.1 Allgemeines **49**
H.2 Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung **49**
H.3 Berechnung von 17β-Estradiol-Äquivalenten für Proben **50**
H.4 Angaben von 17β-Estradiol-Äquivalenten für Proben **50**

Anhang I (informativ) Bestimmung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (G-Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung **52**
I.1 Allgemeines **52**
I.2 Grundlage des Vefahrens **52**
I.3 Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des G-Werts **52**
I.4 Test zur Bestimmung des G-Werts **52**
I.5 Ergebnisbewertung — G-Wert, Abwässer **52**
I.6 Dokumentation der Ergebnisse **53**

Literaturhinweise **55**

Bilder

Bild 1 — Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte nach der Subkultivierung **22**

Bild B.1 — Testplattenbelegung für eine Probe mit 10 sukzessiven Verdünnungsstufen (in dreifacher Ausführung) **29**

Bild C.1 — Testprinzip **30**

Bild F.1 — Zusammenfassung der 17β-Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 ..... **40**

Bild F.2 — Zusammenfassung der bestimmten geringsten nicht wirksamen Verdünnung (G-Wert) der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 ..... **44**

Bild F.3 — Zusammenfassung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 (ausgedrückt in absoluten Differenzen zum angenommenen Wert) **47**

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml) 18

Tabelle 2 — Zusammensetzung des Zelllyse-Gemisches (1 000 ml) 19

Tabelle 3 — Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) 23

Tabelle 4 — Verdünnungsstufen für die Wasserproben 23

Tabelle C.1 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 31

Tabelle C.2 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 31

Tabelle C.3 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 31

Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen (P_r) im Vergleich zu 17β-Estradiol für ausgewählte Verbindungen 33

Tabelle F.1 — Beschreibung der Proben 35

Tabelle F.2 — Überblick über die Proben, die jedes Labor getestet hat 36

Tabelle F.3 — Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse des *In-vitro*-Reportergentest mit humanen Zellen 37

Tabelle F.4 — Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen (LID, *G*-Wert) 41

Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 45