

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 17 β -Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ).....	36
F.1.4 Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen LID (<i>G</i> -Wert)	40
F.1.5 Richtigkeit der Ergebnisse	44
Anhang G (informativ) Statistische Bewertung	48
Anhang H (informativ) Berechnung von 17 β -Estradiol-Äquivalenten.....	49
H.1 Allgemeines.....	49
H.2 Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung	49
H.3 Berechnung von 17 β -Estradiol-Äquivalenten für Proben	50
H.4 Angaben von 17 β -Estradiol-Äquivalenten für Proben.....	50
Anhang I (informativ) Bestimmung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (<i>G</i> -Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung	52
I.1 Allgemeines.....	52
I.2 Grundlage des Verfahrens.....	52
I.3 Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des <i>G</i> -Werts	52
I.4 Test zur Bestimmung des <i>G</i> -Werts.....	52
I.5 Ergebnisauswertung — <i>G</i> -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 17 β -Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5.....	40
Bild F.2 — Zusammenfassung der bestimmten geringsten nicht wirksamen Verdünnung (<i>G</i> -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 Zellyse-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 <i>In-vitro</i>-Reportergergentest 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