E DIN EN ISO 19040-3:2022-09 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2022-07-29

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

Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay (ISO 19040-3:2018); German and English version prEN ISO 19040-3:2022

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 4
Vorwort 5
1 Anwendungsbereich 6
2 Normative Verweisungen 6
3 Begriffe 6
4 Störungen 9
5 Grundlage des Verfahrens 9
6 Geräte und Materialien 9
7 Reagenzien, Zellen und Medien 10
8 Probenahme und Proben 14
8.1 Allgemeines 14
8.2 Flaschen und Materialien für die Probenahme 14
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme 14
8.4 Probenahmeverfahren 14
8.5 Probentransport 14
8.6 Vorbehandlung der Probe 15
8.7 Lagerung der Proben 15
9 Testverfahren 15
9.1 Erhaltung der Zellkultur 15
9.1.1 Einfrieren der Zellen 15
9.1.2 Ansetzen einer neuen Zellkultur 16
9.1.3 Kultivierung der Zellen 16
9.2 Reportergen-Testverfahren mit humanen Zellen 16
9.2.1 Impfen der Zellen (Tag 1) 16
9.2.2 Herstellung der E2-Referenz (Tag 2) 17
9.2.3 Herstellung der Probenverdünnungen (Tag 2) 17
9.2.4 Feldblindwert 18
9.2.5 Exposition der Zellen (Tag 2) 18
9.2.6 Ernten der Zellen (Tag 3) 18
9.2.7 Messung der Lumineszenz (Tag 3) 19
9.3 Datenauswertung 19
9.3.1 Berechnung der Reportergeninduktion 19
9.3.2 Berechnung des Prozentsatzes der maximalen Wirkung 19
9.3.3 Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve 20
10 Gültigkeitskriterien 20
10.1 Gültigkeitskriterien für den Test 20
10.2 Gültigkeitskriterien für die Proben 20
11 Bewertungskriterien 21
12 Untersuchungsbericht 21
Anhang A (informativ) **Konfiguration des Luminometers** 22
Anhang B (informativ) **Testplattenbelegung** 23
Anhang C (informativ) **Eigenschaften und Einzelheiten des Biotests** 24
Anhang D (informativ) **Testung von Chemikalien und Extrakten** 26
D.1 Allgemeines 26
D.2 Extraktion von Wasserproben 26
D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten 26
D.4 Daten aus der Literatur 26
Anhang E (informativ) **Herstellung von Verdünnungsreihen** 28
Anhang F (informativ) **Verfahrenskenndaten** 29
F.1 Beschreibung des Ringversuchs 29
F.1.1 Allgemeines 29

F.1.2 Beschreibung der Proben und teilnehmende Laboratorien 29
F.1.3 Zusammenfassung der 17β-Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ) 30
F.1.4 Zusammenfassung der geringsten, nicht wirksamen Verdünnungen LID (G-Stufe) 34
F.1.5 Richtigkeit der Ergebnisse 37
Anhang G (informativ) **Statistische Bewertung** 41
Anhang H (informativ) **Berechnung von 17β-Estradiol-Äquivalenten** 42
H.1 Allgemeines 42
H.2 Modellierung der Dosis-Wirkungsbeziehung 42
H.3 Berechnung von 17β-Estradioläquivalenten für Testproben 43
H.4 Angabe von 17β-Estradioläquivalenten für Testproben 43
Anhang I (informativ) **Bestimmung der geringsten, nicht wirksamen Abwasserverdünnung (*G*-Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung** 44
I.1 Allgemeines 44
I.2 Prinzip 44
I.3 Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des G-Wertes 44
I.4 Test zur Bestimmung des *G*-Wertes 44
I.5 Ergebnisbewertung — *G*-Wert, Abwässer 44
I.6 Dokumentation der Ergebnisse 44
Literaturhinweise 46

Bilder

Bild 1 — Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte nach der Subkultivierung 16
Bild B.1 — Testplattenbelegung für eine Probe mit 10 sukzessiven Verdünnungsstufen (in dreifacher Ausführung) 23
Bild C.1 — Testprinzip 24
Bild F.1 — Zusammenfassung der 17β-Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 34
Bild F.2 — Zusammenfassung der bestimmten geringsten, nicht wirksamen Verdünnung (LID, G-Stufe) der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 37
Bild F.3 — Zusammenfassung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 (ausgedrückt in absoluten Differenzen zum angenommenen Wert) 40

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml) 13
Tabelle 2 — Zusammensetzung des Zelllyse-Gemisches (1 000 ml) 13
Tabelle 3 — Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) 17
Tabelle 4 — Verdünnungsstufen für die Wasserproben 17
Tabelle C.1 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle C.2 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle C.3 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen (P_r) im Vergleich zu 17β-Estradiol für ausgewählte Verbindungen 27
Tabelle F.1 — Beschreibung der Proben 29
Tabelle F.2 — Überblick über die Proben, die jedes Labor getestet hat 30
Tabelle F.3 — Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse des *In-vitro*-Reportergentest mit humanen Zellen 31
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der geringsten, nicht wirksamen Verdünnungen (LID, *G*-Stufe) 35
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 38