

# 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**

---

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
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 $\beta$ -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 $\beta$ -Estradiol-Äquivalenten.....	49
H.1 Allgemeines.....	49
H.2 Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung .....	49
H.3 Berechnung von 17 $\beta$ -Estradiol-Äquivalenten für Proben .....	50
H.4 Angaben von 17 $\beta$ -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
<b>Bilder</b>	
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 $\beta$ -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**

<b>Tabelle 1 — Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml) .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 2 — Zusammensetzung des Zellyse-Gemisches (1 000 ml) .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabelle 3 — Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17<math>\beta</math>-Estradiol (E2) .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 4 — Verdünnungsstufen für die Wasserproben .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle C.1 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle C.2 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle C.3 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen (<math>P_r</math>) im Vergleich zu 17<math>\beta</math>-Estradiol für ausgewählte Verbindungen .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle F.1 — Beschreibung der Proben .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle F.2 — Überblick über die Proben, die jedes Labor getestet hat .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle F.3 — Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse des <i>In-vitro</i>-Reportergergentest mit humanen Zellen .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle F.4 — Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnungen (LID, <i>G</i>-Wert) .....</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 .....</b>	<b>45</b>