

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, <i>G</i>-Wert) | 41 |
| Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 | 45 |