

DIN CEN/TS 17883



ICS 13.030.01; 13.060.70; 13.080.99

**Umwelttechnische Charakterisierung von Sickerwässern aus Abfall und Boden mittels reproduktiver und toxikologischer Genexpression in *Daphnia magna*;
Deutsche Fassung CEN/TS 17883:2022**

Environmental characterization of leachates from waste and soil using reproductive and toxicological gene expression in *Daphnia magna*;
German version CEN/TS 17883:2022

Caractérisation environnementale des lixiviats de déchets et de sols à l'aide de l'expression génétique reproductive et toxicologique chez *Daphnia magna*;
Version allemande CEN/TS 17883:2022

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17883:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an naw@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss NAW, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin).

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Deutsche Fassung

Umwelttechnische Charakterisierung von Sickerwässern aus
Abfall und Boden mittels reproduktiver und toxikologischer
Genexpression in *Daphnia magna*

Environmental characterization of leachates from waste
and soil using reproductive and toxicological gene
expression in *Daphnia magna*

Caractérisation environnementale des lixiviats de
déchets et de sols à l'aide de l'expression génétique
reproductive et toxicologique chez *Daphnia magna*

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 14. November 2022 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	10
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Kurzbeschreibung	12
4.1 Allgemeines	12
4.2 Toxikogenomisches qPCR-Verfahren	12
4.3 Exposition von <i>Daphnia magna</i>	13
4.4 Auswahl von Genen für die Untersuchung	13
5 Prüfmaterialien	15
5.1 <i>Daphnia magna</i> Referenzwasser	15
5.2 <i>Daphnia magna</i> -Kultur	15
5.2.1 Gewinnung von <i>Daphnia magna</i> aus Kultur	15
5.2.2 Gewinnung von <i>Daphnia magna</i> aus Dauereiern (Ephippia)	15
5.3 Reagenzien	16
6 Geräte	16
7 Durchführung	16
7.1 Auslaugung	16
7.2 Arbeitsvorschrift für die Exposition des Wasserflohs <i>Daphnia magna</i>	16
7.2.1 Einleitung	16
7.2.2 Prüfung der akuten Schwimmfähigkeit	16
7.3 Probenahme von <i>Daphnia magna</i> für die Genexpressionsanalyse	17
7.4 RNA-Extraktion	18
7.4.1 Allgemeines	18
7.4.2 Durchführung	18
7.4.3 Bestimmung der Qualität und Quantität von RNA	19
7.5 DNA-Synthese	19
7.5.1 Allgemeines	19
7.5.2 Reagenzien	19
7.5.3 Durchführung	19
7.6 qPCR-Verfahren	20
7.6.1 Allgemeines	20
7.6.2 Arbeitsvorschrift	20
7.7 Analyse der Ergebnisse	20
7.8 Auswertung der Ergebnisse	20
7.8.1 Allgemeines	20
7.8.2 Anzahl betroffener Gene	21
7.8.3 Erhöhung oder Verringerung	21
7.8.4 Reaktionsgrad	21
7.8.5 Statistische Signifikanz	21
7.8.6 Kombinierte Auswertung	21
7.8.7 Verwendung von Ergebnissen in Gefährdungseinschätzungen	21
Anhang A (informativ) Darstellung und Auswertung toxikogenomischer Daten	23
Literaturhinweise	26

Bilder

Bild 1 — Unterschiede in physiologischer Auswirkung und mechanistischer Auflösung auf verschiedenen Organisationsebenen	5
Bild 2 — Entstehung eines unerwünschten Ergebnisses	6
Bild 3 — Prüfung der Wirkung identifizierter Verunreinigungen in Abfällen, Böden oder Wasser	8
Bild 4 — Hauptaufgaben der Bestimmung der Anzahl spezifischer RNA mittels qPCR. A) Exposition der <i>Daphnia magna</i> gegenüber der Prüflösung B) Extraktion von mRNA, cDNA-Synthese und qPCR	12
Bild A.1 — Prüfung der akuten Toxizität	23
Bild A.2 — Toxikogenomische Analyse	24
Bild A.3 — Genexpression von MTA, Cat und Hsp60	24

Tabellen

Tabelle 1 — Gene mit Bezeichnung, Funktion und Wirkung	13
Tabelle 2 — Liste von Gen-Primern	14

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17883:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 444 „Umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokument Gegenstand von Patentrechten sein können. CEN ist nicht verantwortlich für die Identifizierung solcher Patentrechte.

Alle Rückmeldungen und Fragen zu diesem Dokument sollten an die nationale Normungsorganisation des Benutzers gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Stellen ist auf der CEN-Website zu finden.

Nach der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsorganisationen der folgenden Länder verpflichtet, diese Technische Spezifikation zu veröffentlichen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkiye, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Ziel dieses Dokuments ist es, das Verfahren zur Vorbereitung und Durchführung einer quantitativen PCR zu beschreiben, mit der die Auswirkungen von Sickerwasser aus Abfällen und Böden auf reproduktive und toxi-kologische Endpunkte bei *Daphnia magna* quantifiziert werden. Das beschriebene Verfahren ermöglicht einen schnellen, robusten und empfindlichen Nachweis molekularer Reaktionen und kann zur Analyse der toxischen Wirkungen von Sickerwasser aus Böden und Abfällen sowie der Empfängerengewässer verwendet werden.

Die Untersuchung von Messenger-RNA (mRNA) verschiedener lebender Organismen unter Verwendung ver-schiedener molekularer Ansätze kann zur Identifikation der Reaktionen von Organismen auf die Exposition gegenüber toxischen Stoffen verwendet werden. Messenger-RNA (mRNA) überträgt Informationen aus der DNA, die alle für das Leben notwendigen Informationen speichert, an die zelluläre Maschinerie, die Proteine synthetisiert. Proteine sind die Arbeitseinheiten in der Zelle und ihre Anzahl ist in hohem Maße von den RNA-Werten in der Zelle abhängig, da alle Proteine Translationsprodukte der mRNA sind. Da die mRNA der erste Schritt der Reaktion auf toxische Stoffe ist, ist sie auch ein schneller, präziser und empfindlicher Bio-marker für die Exposition, der Informationen über die Mechanismen liefert, die für das Reaktionsverhalten verantwortlich sind. Die Beziehung zwischen physiologischer Auswirkung und mechanistischer Auflösung ist in Bild 1 dargestellt.

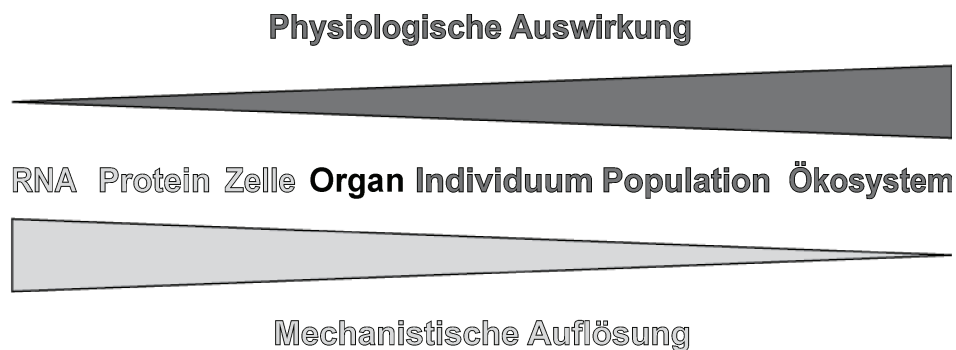


Bild 1 — Unterschiede in physiologischer Auswirkung und mechanistischer Auflösung auf verschiedenen Organisationsebenen

Zwischen der Bestimmung der Wirkung eines toxischen Stoffs und dem Verständnis der Ursache dieser Wirkung besteht ein wichtiger Unterschied. Wirkungen, die ganzen Ökosystemen Schaden zufügen, werden üblicherweise durch Veränderungen der Populationen festgestellt. Wirkungen auf der Ebene des Organismus/Individuums lassen sich am einfachsten an Veränderungen der Physiologie, der Morphologie oder des Verhaltens eines Organismus beobachten. Da die Umwelt jedoch sehr komplex und stark veränderlich ist, hat die Messung von Veränderungen in Ökosystemen, Populationen oder Individuen im Zusammenhang mit der Ermittlung der Ursache einer beobachteten Wirkung eine sehr geringe Auflösung. Um „kollektive Beschuldigungen“ zu vermeiden, ist es wichtig, den Zusammenhang zwischen einer Exposition und der beobachteten Wirkung zu identifizieren. Die empfindlichsten Verfahren hierfür sind auf der RNA-Ebene und bei der Proteinregulierung auf der zellulären Ebene angesiedelt. RNA ist das Bindeglied zwischen Proteinen und der chromosomalen DNA (Gene). Die chromosomal lokalisierten Gene können auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden, doch unabhängig vom Regulationsmechanismus führt die Exposition gegenüber toxischen Stoffen zu einer Veränderung der aktiven RNA und somit auch des jeweiligen Proteins.

Eine toxische Reaktion wird durch ein molekulares initiiertes Ereignis (MIE) ausgelöst. Hierbei kann es sich um die Exposition gegenüber einer anorganischen oder organischen Verbindung sowie gegenüber Radioaktivität handeln. Auf das MIE folgt die molekulare Interaktion zwischen der Verbindung, die das MIE auslöst, und einem Molekül (Rezeptoraktivierung, Proteinbindung, DNA-Bindung), die zu Veränderungen in diversen Schlüsselereignissen (SE) führt, beginnend mit Veränderungen der Genexpression, die zu Veränderungen in der Proteinproduktion führen. Dies wiederum führt zu einer veränderten Signalkaskade, die zu Veränderungen in den Funktionen von Zellen, Geweben und Organen führen kann, wenn sie die homöostatische Kontrolle umgeht. Diese funktionalen Veränderungen können dann zu unerwünschten Ergebnissen (UE) wie Fehlbil-

dungen, Organdysfunktionen und schließlich zum Tod führen. Daraus ergibt sich ein UE von regulatorischer Relevanz für die Gefährdungseinschätzung, das entweder auf Organismus- oder auf Populationsebene eine offenkundige Beeinträchtigung darstellt (Bild 2).

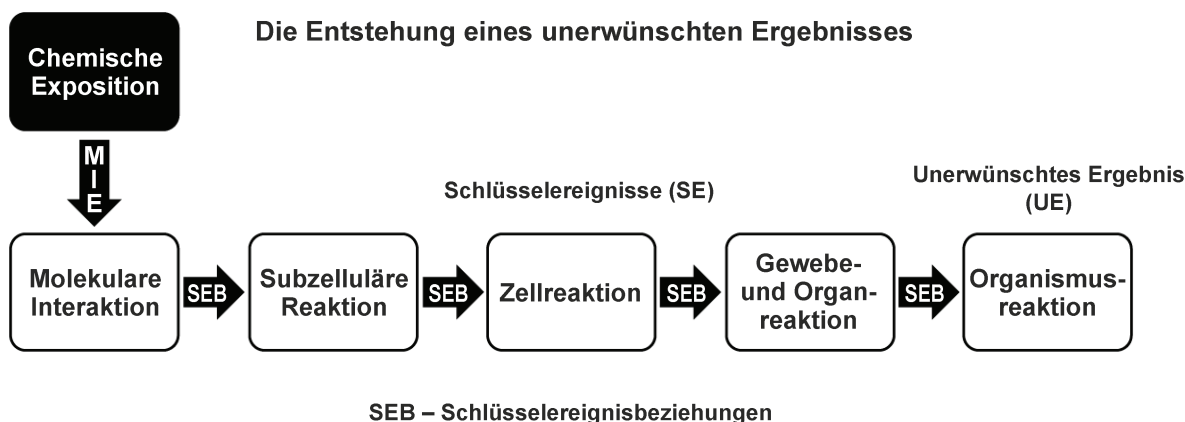


Bild 2 — Entstehung eines unerwünschten Ergebnisses

Eine EUE (Entstehung eines unerwünschten Ergebnisses) beginnt mit einer molekularen Interaktion zwischen einer Chemikalie und einem Molekül. Dieser Schritt wird als molekulares initiiertes Ereignis (MIE) bezeichnet. Darauf folgt eine Reihe von Schlüsselereignissen (SE), die das Signal an höhere Organisationsebenen weitergeben. Dies führt zu einem Ergebnis hinsichtlich der Physiologie eines Organismus, und wenn dieses Ergebnis beeinträchtigend ist, wird es als unerwünschtes Ergebnis (UE) bezeichnet. Der vollständige Ereignisablauf wird daher als Entstehung eines UE (EUE) bezeichnet und verbindet die anfängliche Exposition über eine molekulare Interaktion mit einer physiologischen Veränderung im Organismus. Bei ausreichenden Konzentrationen der Chemikalie und Expositionszeitspannen kann ein SE so dominant werden, dass es ein anderes SE beendet und die Abwehrmechanismen und Adaptationsprozesse der Zellen überwindet.

Damit es zu einem UE kommt, muss also zunächst eine molekulare Interaktion auftreten, die zu Veränderungen der Genaktivität führt. Während das UE das Maß für die Schädigung/Toxizität der Exposition ist, sind die anfänglichen Veränderungen der Genaktivität eine direkte Reaktion auf die Exposition.

Das toxikogenomische qPCR-Verfahren ermöglicht es, das erste SE in der Kaskade, die vom MIE zum UE führt, direkt zu messen. Dies kann durch die Analyse von Genen geschehen, die mit der gewählten EUE in Verbindung stehen, z. B. Metalltoxizität, xenobiotische Toxizität, Stressreaktion, Reproduktion, Stoffwechsel, Atmung, Zellzyklus (Krebs und Apoptose). Durch die Ermittlung der Korrelation zwischen signifikanten Veränderungen der Genexpression und spezifischen EUE ist es somit möglich, den auslösenden Faktor zu identifizieren. Eine fehlende Korrelation zwischen einer EUE und dessen MIE zeigt an, dass die Exposition im Zusammenhang mit dieser EUE keine Auswirkungen hat. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es die Identifizierung der Ursache des UE ermöglicht, da jedes Gen durch einen spezifischen Satz von Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

Die Analyse von RNA-Werten ist daher das robusteste und empfindlichste Verfahren zur Bestimmung des Mechanismus, der die Wirkungen hervorruft, die nach einer Exposition beobachtet werden. Zum Vergleich kann die Reproduktion von *Daphnia magna* durch Zählen des Nachwuchses in einer Untersuchung über 21 Tage analysiert werden. Eine Ab- oder Zunahme des Nachwuchses zeigt an, dass die Exposition die Reproduktion beeinflusst. Gleichzeitig wird eine kurze Exposition (24 h bis 96 h) mit einer anschließenden Analyse der RNA-Werte zu zeigen in der Lage sein, ob sich die für die Reproduktion erforderliche Maschinerie verändert hat.

Ein Vorteil der Analyse der Genregulierung besteht darin, dass die Induktion oder Reduktion der RNA unmittelbar mit spezifischen Verbindungen korreliert, die die Genexpression regulieren können. Eine Kombination

der Analyse der reproduktiven RNA mit der Analyse der RNA durch Messung der Toxizität ermöglicht somit die Feststellung, welcher Typ toxischer Wirkung durch die Verbindungen auftritt, denen der Organismus ausgesetzt ist. Durch Analysieren der RNA-Regulierung ist es daher möglich, Wirkungen zu bestimmen, die sowohl mit HP10 (reproduktionstoxisch) als auch mit HP14 (ökotoxisch, d. h. toxisch für Organismen in der Umwelt) in Verbindung stehen.

Während junge Daphnien (24 h bis 48 h alt) verwendet werden können, um die Expression von Genen zu untersuchen, die mit biologischen Stoffwechselwegen in Verbindung stehen, die während der Frühentwicklung des Tieres aktiviert werden (d. h. Metallreaktion, oxidativer Stress), sind ältere Daphnien (> 72 h alt) erforderlich, um Auswirkungen der untersuchten Verbindung auf Gene zu analysieren, die mit Stoffwechselwegen in Verbindung stehen, die ihre Funktionalität in späteren Lebensabschnitten wie z. B. der Reproduktion entfalten. Um Gene abzudecken, die an Entwicklung, Toxizität und Reproduktion beteiligt sind, ist es daher wichtig, die Tiere ab Schlüpfen/Geburt bis 96 h zu exponieren.

Die Analysen können auf Grundlage früherer chemischer Daten konzipiert werden, die den angestrebten Expositionstyp der *Daphnia magna* anzeigen. Die Auflösung der Untersuchung kann durch die Auswahl spezifischer Gene erhöht werden, deren Reaktion auf spezifische Einflüsse bekannt ist. Darüber hinaus ist es möglich, durch kontrollierte Exposition gegenüber spezifischen Verbindungen zu ermitteln, ob diese zu einer gemessenen biologischen Wirkung beitragen (siehe Bild 3). So lässt sich bestimmen, ob die Wirkung durch eine betrachtete Verbindung oder durch üblicherweise auftretende abiotische Eigenschaften der Expositionslösung verursacht wird.