

DIN EN ISO 21427-2



ICS 13.060.50

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest –
Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie
(ISO 21427-2:2006);
Deutsche Fassung EN ISO 21427-2:2009**

Water quality –

Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei –
Part 2: Mixed population method using the cell line V79 (ISO 21427-2:2006);
German version EN ISO 21427-2:2009

Qualité de l'eau –

Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux –
Partie 2: Méthode de la population mélangée à l'aide de la lignée de cellules V79
(ISO 21427-2:2006);
Version allemande EN ISO 21427-2:2009

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-03-07-03 AK „Gentoxizität“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T).

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest — Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (T 5):

Verfahren DIN EN ISO 21427-2 — T 5

Diese Norm wurde für die Anwendung im Rahmen der Umsetzung der Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik*) entwickelt.

Für die Anwendung in Deutschland wird folgender Hinweis gegeben:

In 6.2.2 sowie in 6.2.15 wurden die in der englischen Fassung enthaltenen falschen Summenformeln bereits ersetzt.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5667-1	siehe DIN EN ISO 5667-1
ISO 5667-3	siehe DIN EN ISO 5667-3
ISO 5667-10	siehe DIN 38402-11
ISO 5667-16	siehe DIN EN ISO 5667-16
ISO 13829	siehe DIN 38415-3
ISO 16240	siehe DIN 38415-4

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

*) Nachgewiesen in der DITR-Datenbank der DIN Software GmbH, zu beziehen bei: Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Die als DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV*) nach § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz — WHG*) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG als Loseblattsammlung „Analysenverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ (Ergänzungsbände) von der Beuth Verlag GmbH herausgegeben worden.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

*) Nachgewiesen in der DITR-Datenbank der DIN Software GmbH, zu beziehen bei: Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN 38402-11, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Teil 11: Probenahme von Abwasser (A 11)*

DIN 38415-3, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) — Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T 3)*

DIN 38415-4, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) — Teil 4: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test) (T 4)*

DIN EN ISO 5667-1, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 1: Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 5667-3, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Wasserproben*

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

- [1] REIFFERSCHIED, G., DILL, F., FIEBLINGER, D., GMINSKI, R., GRUMMT, H. J., HAFNER, C., HOLLERT, H., KUNZ, S., RODRIGO, G., STOPPER, H., ZIEMANN, C. und SELKE, D.: Measurement of genotoxicity in wastewater samples – Results of a collaborative study on the in vitro micronucleus test in the context of standardisation according to ISO. *Mutation Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.015>

Deutsche Fassung

**Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest —
Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten
V79-Zellkulturlinie
(ISO 21427-2:2006)**

Water quality —
Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction
of micronuclei —
Part 2: Mixed population method using the cell line V79
(ISO 21427-2:2006)

Qualité de l'eau —
Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction
de micronoyaux —
Partie 2: Méthode de la population mélangée à l'aide de la
lignée de cellules V79 (ISO 21427-2:2006)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 1. März 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

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



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

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Grundlage des Verfahrens	6
5 Störungen	6
6 Reagenzien und Medien	6
6.1 Wasser	6
6.2 Reagenzien	6
6.3 Herstellung der Kulturmedien	8
6.4 Zellsystem	9
6.5 Metabolische Aktivierung	10
7 Geräte	10
8 Anforderungen an die Testeinrichtung	11
9 Durchführung	11
9.1 Probenahme und Proben	11
9.2 Experimenteller Umfang	12
9.3 Negativkontrollen	13
9.4 Positivkontrollen	13
9.5 Zeitplan	13
9.6 Vorbereitungsschritte	13
9.7 Vorbereitung der Testkultur	13
9.8 Testdurchführung	14
10 Testauswertung und Bewertung	15
10.1 Zellmorphologie	15
10.2 Auswahl der auszuwertenden Probenkonzentrationen	15
10.3 Auswertung der Objektträger	16
10.4 Mitoseindex	16
10.5 Survivalindex	16
10.6 Proliferationsindex	16
10.7 Gültigkeitskriterien	17
10.8 Bewertungskriterien	17
10.9 Bestimmung des maßgeblichen G-Werts	17
11 Verfahrenskenndaten	17
12 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Bromdesoxiuridinverfahren (BrdU-Verfahren)	19
Anhang B (informativ) Bewertungsschemata	21
Anhang C (normativ) S9-Fraktion	22
Anhang D (informativ) Verfahrenskenndaten	23
Literaturhinweise	24

Vorwort

Der Text von ISO 21427-2:2006 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 21427-2:2009 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21427-2:2006 wurde vom CEN als EN ISO 21427-2:2009 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

WARNUNG — Anwender dieses Teils von ISO 21427 sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Teil von ISO 21427 Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 21427 legt ein Verfahren zur Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser mit einem In-vitro-Test mit Säugetierzellen fest. Mit dem Verfahren können durch Wasserinhaltsstoffe verursachte zytogenetische Schäden an den Chromosomen oder am Mitoseapparat der V79-Zellen des Chinesischen Hamsters nachgewiesen werden.

Die dabei entstehenden Mikrokerne können Chromosomenbruchstücke und/oder ganze Chromosomen beinhalten.

Der Test basiert auf einer Zunahme der Häufigkeit von mikrokernhaltigen Zellen infolge der Einwirkung von erbgutverändernden Substanzen mit und ohne Zugabe eines metabolisierenden Systems.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 5667-16, *Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

**3.1
Zelllinien**
bestimmte Zellen einer Gewebeart, die von einem einzigen Klon abstammen und in einer Kultur gewachsen sind

**3.2
Kofaktorenlösung**
wässrige Lösung von chemischen Stoffen (z. B. NADP, Glukose-6-phosphat und anorganische Salze), die für die Aktivität der Enzyme der S9-Fraktion erforderlich sind

**3.3
Verdünnungsstufe
G**
Angabe des ganzzahligen Volumenverhältnisses einer Mischung von Abwasser mit Verdünnungswasser

ANMERKUNG Für unverdünntes Wasser oder Abwasser ist dieser Faktor laut Definition 1:1. Der entsprechende kleinstmögliche G-Wert ist 1.

3.4

G-Wert

kleinster Wert von G, bei dem unter den Bedingungen nach diesem Teil von ISO 21427 keine Erhöhung der Anzahl von Mikrokernen je Kultur nachgewiesen wird

ANMERKUNG Im Falle von mehr als einem G-Wert (es sind maximal 2 möglich, siehe 9.2) ist der höhere G-Wert maßgebend.

3.5

Karyotyp

Eigenschaften eines Zellkerns, einschließlich seiner Größe, Form und Chromosomenzahl

3.6

Mikrokerne

kleine, von einer eigenen Kernmembranhülle umgebene Partikel, die aus azentrischen Chromosomenfragmenten und/oder ganzen Chromosomen bestehen, welche während der Zellteilung in der Anaphase zurückbleiben und nach der Telophase einzelne oder mehrere Mikrokerne im Zellplasma bilden

3.7

Mitoseindex

prozentualer Anteil an Zellen einer Zellpopulation im Zustand der Zellteilung zu einem bestimmten Beobachtungszeitpunkt

3.8

Koloniebildungsfähigkeit

Angehrate

Quotient aus der beobachteten Koloniezahl und der Ausgangszellzahl

3.9

Proliferationsindex

Teilungsrate der Zellen in der Kultur

3.10

Proliferationsrate

Vermehrungsrate der Zellen, berechnet mit einer mathematischen Formel, die 1, 2, 4 und 8 Zellstadien der Klone berücksichtigt

3.11

S9-Fraktion

Überstand eines mit 9 000 g zentrifugierten Gewebehomogenates in 0,15 mol/l KCl, das aus Lebern männlicher Ratten (200 g bis 300 g), die zur Enzyminduktion mit einer geeigneten Substanz oder Substanzkombination vorbehandelt wurden, hergestellt wird

3.12

S9-Mix

Mischung aus S9-Fraktion und Kofaktorenlösung

3.13

Stammkultur

gefrorene Kultur zur Erhaltung der Eigenschaften der V79-Zellen

3.14

Survivalindex

prozentualer Anteil der überlebenden Zellen an der Gesamtzellanzahl als Index für die Toxizität

3.15

Testkultur

Kultur von Zellen zur Durchführung des Testverfahrens