DIN EN ISO 19040-2:2023-12 (D)

Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser - Teil 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, Arxula adeninivorans) (ISO 19040-2:2018); Deutsche Fassung EN ISO 19040-2:2022

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 5
Vorwort 6
1 Anwendungsbereich 7
2 Normative Verweisungen 7
3 Begriffe 7
4 Grundlage des Verfahrens 10
5 Störungen 10
6 Geräte und Materialien 10
7 Reagenzien, Medien und Teststamm 11
7.1 Reagenzien 11
7.2 Wasser, Qualität 3 nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 µS/cm oder Reinstwasser ist geeignet. 13
7.3 Teststamm 13
7.4 Medien 13
8 Probenahme und Proben 15
8.1 Allgemeines 15
8.2 Flaschen und Probenmaterial 15
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme 15
8.4 Probenahmeverfahren 16
8.5 Probentransport 16
8.6 Vorbehandlung von Proben 16
8.7 Lagerung von Proben 16
9 Testverfahren 17
9.1 Testansatz 17
9.1.1 Herstellung der Verdünnungen des Referenzstandards 17
9.1.2 Reaktivierung der Hefe 17
9.1.3 Negativkontrolle 18
9.1.4 Leer-Replikat 18
9.1.5 Probenverdünnung 18
9.1.6 Feldblindwert 19
9.1.7 Plattenbelegung 19
9.1.8 Inokulation der Testplatte 19
9.2 Messung 21
9.2.1 Messung der Reportergenaktivität 21
9.2.2 Messung der Zelldichte 21
9.3 Berechnungen 22
9.3.1 Hintergrundkorrektur 22
9.3.2 Berechnung des relativen Wachstums 23
9.3.3 Berechnungen zur Bewertung von Proben-Leer-Replikaten 23
9.3.4 Berechnung der Reportergeninduktion 25
10 Gültigkeitskriterien 28
11 Bewertungskriterien 29
12 Untersuchungsbericht 29
13 Verifizierung 30
Anhang A (informativ) **Testplattenbelegung** 31

A.1 Allgemeines . . . 31
A.2 Testplattenbelegung . . . 31
Anhang B (informativ) **Gefriertrocknung von *Arxula adeninivorans*-Zellen** . . . 32
B.1 Allgemeines . . . 32
B.2 Reagenzien . . . 32
B.3 Medien . . . 32
B.3.1 Glucose-Lösung . . . 32
B.3.2 Sorbitol-Lösung . . . 32
B.3.3 PBS-Puffer . . . 32
B.3.4 Kryo-Medium . . . 32
B.3.5 Lysin-Lösung . . . 32
B.3.6 Hefeminimalmedium (HMM) mit Glucose . . . 33
B.3.7 Hefeminimalmedium (HMM) mit Sorbitol . . . 33
B.4 Kultivierung von *Arxula adeninivorans* auf festen Nährböden . . . 33
B.5 Kultivierung der Start- und Hauptkultur . . . 33
B.6 Herstellung lyophilisierter *Arxula adeninivorans*-Zellen . . . 33
Anhang C (informativ) **Schema des Testprinzips** . . . 34
Anhang D (informativ) **Testung von Chemikalien und Extrakten** . . . 35
D.1 Allgemeines . . . 35
D.2 Extraktion von Wasserproben . . . 35
D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen und Extrakten . . . 35
Anhang E (informativ) **Herstellung von Verdünnungsreihen** . . . 36
Anhang F (informativ) **Verfahrenskenndaten** . . . 37
F.1 Validierungsstudie . . . 37
F.1.1 Proben und teilnehmende Laboratorien . . . 37
F.1.2 Ergebnisse für die geringste nicht wirksame Verdünnung (*G*-Wert) und für die 17β-Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) . . . 37
F.1.3 Richtigkeit der Ergebnisse . . . 45
F.2 Sensitivität gegenüber ausgewählten Verbindungen . . . 48
Anhang G (informativ) **Statistische Bewertung** . . . 50
Anhang H (informativ) **Berechnung von 17β-Estradiol-Äquivalenten für Proben** . . . 51
H.1 Allgemein . . . 51
H.2 Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung . . . 51
H.3 Berechnung von Estradiol-Äquivalenten für Proben . . . 52
H.4 Angabe von Estradiol-Äquivalenten für Proben . . . 52
Anhang I (informativ) **Alternatives Testdesign für die EEQ-Bestimmung** . . . 54
Anhang J (informativ) **Messung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (*G*-Wert)— Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung** . . . 56
J.1 Allgemeines . . . 56
J.2 Grundlage des Verfahrens . . . 56
J.3 Herstellung der Verdünnungen für die Bewertung des *G*-Werts . . . 56
J.4 *G*-Wert-Testung . . . 56
J.5 Bewertung der Ergebnisse — *G*-Wert, Abwasser . . . 56
J.6 Dokumentation der Ergebnisse . . . 56
Anhang K (informativ) **Beispiel für eine statistische Auswertung** . . . 57
K.1 Allgemeines . . . 57
K.2 Berechnungen . . . 57
K.2.1 Hintergrundkorrektur . . . 57
K.2.2 Berechnung des relativen Wachstums . . . 57
K.2.3 Berechnungen zur Bewertung von Proben-Leer-Replikaten . . . 58
K.2.4 Berechnungen zur Bewertung der Probentrübung . . . 58
K.2.5 Berechnung der Reportergeninduktion . . . 58
K.2.6 Berechnung der Induktionsraten . . . 59
Literaturhinweise . . . 63

Bilder

Bild C.1 — Schema des Testprinzips in *Arxula adeninivorans* **34**

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung der E2-Verdünnungsreihe für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung . **17**
Tabelle 2 — Schüttelfrequenzen in Abhängigkeit des Orbits des Schüttlers **18**
Tabelle A.1 — Plattenbelegung für die Analyse von zwei Proben mit acht aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen mit jeweils vier Replikaten **31**
Tabelle E.1 — Herstellung von Verdünnungsreihen **36**
Tabelle F.1 — Beschreibung der Pflichtproben **37**
Tabelle F.2 — Beschreibung der ISO 19040-2 spezifischen Proben **37**
Tabelle F.3 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für *G*-Werte, die mit dem *Arxula* Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden **38**
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der Verfahrenskenndaten für interpolierte *G*-Werte, die mit dem *Arxula* Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden **40**
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für 17β-Estradiol-Äquivalente, die mit dem *Arxula* Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden **43**
Tabelle F.6 — Bewertung der Richtigkeit für die Proben 2, 5, 8 und 9 . . . . . **46**
Tabelle F.7 — Relative Potenz zu 17β-Estradiol für ausgewählte Verbindungen **48**
Tabelle I.1 — Beispiel für eine Plattenbelegung mit 12 Proben für das alternative Testdesign zur EEQ-Bestimmung **54**
Tabelle K.1 — Gemessene und berechnete Werte für Leer-Replikate **59**
Tabelle K.2 — Gemessene und berechnete Werte der Negativkontrolle und Referenzverbindung **60**
Tabelle K.3 — Gemessene und berechnete Werte der untersuchten Probe **61**