

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

Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser - Teil 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adenivorans*) (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 Reporterogenaktivität	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 Reporterogeninduktion	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 <i>Arxula adenivorans</i> -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 <i>Arxula adenivorans</i> auf festen Nährböden	33
B.5	Kultivierung der Start- und Hauptkultur	33
B.6	Herstellung lyophilisierter <i>Arxula adenivorans</i> -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 (<i>G</i> -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 (<i>G</i> -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 <i>G</i> -Werts	56
J.4	<i>G</i> -Wert-Testung	56
J.5	Bewertung der Ergebnisse — <i>G</i> -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 <i>Arxula adenivorans</i>	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 <i>G</i> -Werte, die mit dem <i>Arxula Yeast Estrogen Screen</i> (A-YES) erzielt wurden	38
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für interpolierte <i>G</i> -Werte, die mit dem <i>Arxula Yeast Estrogen Screen</i> (A-YES) erzielt wurden	40
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für 17 β -Estradiol-Äquivalente, die mit dem <i>Arxula Yeast Estrogen Screen</i> (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 17 β -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

