

# 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 17 $\beta$ -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 17 $\beta$ -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 Probenrührung	58
K.2.5	Berechnung der Reporterogeninduktion	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 (A-YES)</i> erzielt wurden . . . . .	38
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für interpolierte <i>G</i> -Werte, die mit dem <i>Arxula Yeast Estrogen Screen (A-YES)</i> erzielt wurden . . . . .	40
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für $17\beta$ -Estradiol-Äquivalente, die mit dem <i>Arxula Yeast Estrogen Screen (A-YES)</i> erzielt wurden . . . . .	43
Tabelle F.6 — Bewertung der Richtigkeit für die Proben 2, 5, 8 und 9 . . . . .	46
Tabelle F.7 — Relative Potenz zu $17\beta$ -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



