



Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

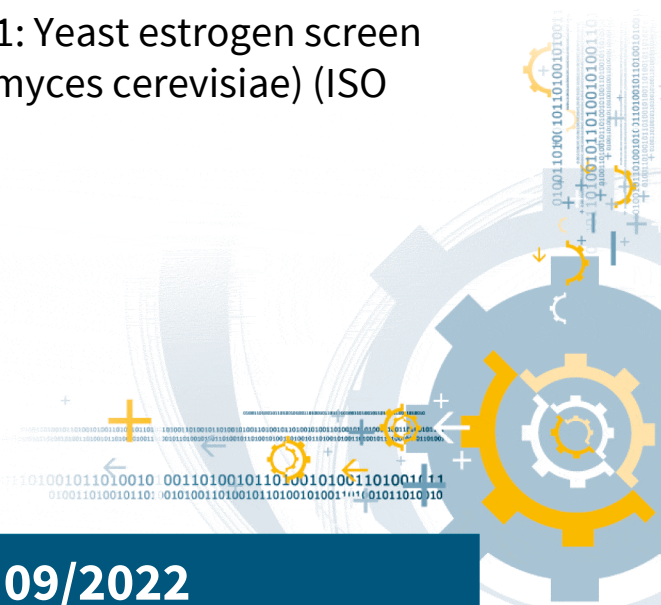
ILNAS-EN ISO 19040-1:2022

Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser - Teil 1: Hefe- Estrogenscreening (Saccharomyces

Qualité de l'eau - Détermination du
potentiel oestrogénique de l'eau et des
eaux résiduelles - Partie 1: Essai
d'oestrogénicité sur levures

Water quality - Determination of the
estrogenic potential of water and waste
water - Part 1: Yeast estrogen screen
(Saccharomyces cerevisiae) (ISO

09/2022



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN ISO 19040-1:2022 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN ISO 19040-1:2022 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

ILNAS-EN ISO 19040-1:2022

EUROPÄISCHE NORM **EN ISO 19040-1**

EUROPEAN STANDARD

NORME EUROPÉENNE

September 2022

ICS 13.060.70

Deutsche Fassung

**Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des estrogenen
Potentials von Wasser und Abwasser - Teil 1: Hefe-
Estrogenscreening (*Saccharomyces cerevisiae*) (ISO 19040-
1:2018)**

Water quality - Determination of the estrogenic
potential of water and waste water - Part 1: Yeast
estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*) (ISO
19040-1:2018)

Qualité de l'eau - Détermination du potentiel
oestrogénique de l'eau et des eaux résiduaires - Partie
1: Essai d'oestrogénicité sur levures (*Saccharomyces
cerevisiae*) (ISO 19040-1:2018)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 19. September 2022 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, 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	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Grundlage des Verfahrens	10
5 Störungen	11
6 Geräte und Materialien	11
7 Reagenzien, Teststamm und Medien	12
7.1 Reagenzien	12
7.2 Wasser, Qualität 3 nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 µS/cm ist geeignet.	13
7.3 Teststamm	13
7.4 Medien	14
7.4.1 10× SD-Medium	14
7.4.2 10× McD-DO-Medium (McDonnell)	14
7.4.3 Glucoselösung	14
7.4.4 CuSO ₄ -Lösung, 10 mmol/l	14
7.4.5 Ampicillin-Stammlösung	14
7.4.6 Streptomycin-Stammlösung	14
7.4.7 Wachstumsmedium (McDonnell)	15
7.4.8 Expositionsmedium (McDonnell)	15
7.4.9 Wässrige ethanolische Lösung, Volumenanteil 0,3 %.	15
7.4.10 Wässrige Glycerinlösung, Volumenanteil 30 %.	15
7.4.11 17β-Estradiol (E2) Stammlösung.	15
7.4.12 LacZ-Puffer.	15
7.4.13 LacZ-Reaktionsmischung	16
8 Probenahme und Proben	16
8.1 Allgemeines	16
8.2 Flaschen und Probenmaterial	16
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme	16
8.4 Probenahmeverfahren	17
8.5 Probentransport	17
8.6 Vorbehandlung der Proben	17
8.7 Lagerung der Proben	17
9 Testverfahren	18
9.1 Herstellung von Kryokulturen für die Langzeitlagerung	18
9.2 Übernachtkultur	18
9.3 Testansatz für wässrige Proben	18
9.3.1 Vorbereitung	18
9.3.2 Herstellung der Referenzverdünnungsreihe	19
9.3.3 Negativkontrolle	20
9.3.4 Leer-Replikate	20
9.3.5 Probenverdünnung	20
9.3.6 Feldblindwert	20
9.3.7 Plattenbelegung	21
9.3.8 Animpfen der Testplatte	21
9.4 Messung	22
9.4.1 Messung der Zelldichte	22
9.4.2 Messung der Reportergenaktivität	22
9.5 Berechnung der korrigierten Extinktion und der Reportergeninduktion	23

9.6	Berechnung des relativen Wachstums	24
9.7	Bestimmung der EC ₅₀ der Referenzverbindung durch lineare Interpolation	24
10	Gültigkeitskriterien	24
11	Bewertungskriterien	25
12	Untersuchungsbericht	25
Anhang A (normativ) Stammselektion		26
A.1	Allgemeines	26
A.2	Agarplatten zur Stammselektion	26
A.3	Ausplattieren des Teststamms	26
Anhang B (informativ) Testplattenbelegung		27
Anhang C (informativ) Schema des Testprinzips		28
Anhang D (informativ) Testung von Chemikalien und Extrakten		29
D.1	Allgemeines	29
D.2	Extraktion von Wasserproben	29
D.3	Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten	29
D.4	Direktes Testen von organischen Lösungen oder Extrakten	29
D.5	Daten aus der Literatur	30
Anhang E (informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen		33
Anhang F (informativ) Verfahrenskennndaten		35
F.1	Design des Ringversuchs	35
F.1.1	Allgemeines	35
F.1.2	Beschreibung der Proben	35
F.1.3	Teilnehmende Labore	36
F.2	Ergebnisse des Ringversuchs	36
F.2.1	Allgemeines	36
F.2.2	Zusammenfassung der 17 β -Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ)	37
F.2.3	Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung LID (G-Wert)	42
F.2.4	Richtigkeit der Ergebnisse	47
Anhang G (informativ) Verwendung anderer Hefestämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		51
G.1	Allgemeines	51
G.2	Teststamm nach Routledge und Sumpter [(25)]	51
G.2.1	Allgemeines	51
G.2.2	Beschreibung des Teststammes	51
G.2.3	Medien	51
G.2.4	Stammselektion	52
G.2.5	Durchführung	53
G.2.6	Gültigkeitskriterien	53
Anhang H (informativ) Statistische Bewertung		54
Anhang I (informativ) Berechnung von 17 β -Estradiol-Äquivalenten		56
I.1	Allgemeines	56
I.2	Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung	56
I.3	Berechnung von 17 β -Estradiol-Äquivalenten für Proben	57
I.4	Angaben von Estradiol-Äquivalenten für Proben	57
Anhang J (informativ) Bestimmung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (G-Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung		59
J.1	Allgemeines	59
J.2	Grundlage des Verfahrens	59
J.3	Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des G-Werts	59
J.4	Test zur Bestimmung des G-Werts	59
J.5	Ergebnisbewertung — G-Wert, Abwässer	59
J.6	Dokumentation der Ergebnisse	60
Literaturhinweise		61

Bilder

Bild C.1 — Grundlegendes Testprinzip des YES	28
Bild F.1 — Zusammenfassung der 17β -Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der Proben S2, S3, S5, S7 und S8	42
Bild F.2 — Zusammenfassung der geringsten nicht wirksamen Verdünnung (<i>G</i> -Wert) der Proben S2, S3, S5, S7 und S8	46
Bild F.3 — Zusammenfassung der Richtigkeit für die Proben S5 und S7 (ausgedrückt in absoluten Differenzen zum angenommenen Wert)	50

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung der E2-Verdünnungsreihe	19
Tabelle B.1 — Belegung mit zwei Proben und sieben aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen mit vier Replikaten	27
Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen im Vergleich zu 17β -Estradiol für ausgewählte Verbindungen	31
Tabelle E.1 — Herstellung von Verdünnungsreihen	33
Tabelle F.1 — Beschreibung der Proben	35
Tabelle F.2 — Überblick über die getesteten Proben	36
Tabelle F.3 — Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse [ng/l] des Yeast Estrogen Screen (YES, McDonnell [10])	38
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der <i>G</i> -Werte des Yeast Estrogen Screen (YES, McDonnell [10]) .	43
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S5 und S7 (Yeast Estrogen Screen (YES, McDonnell [10]))	48

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 19040-1:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 19040-1:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 19040-1:2018 wurde von CEN als EN ISO 19040-1:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 5, *Biological methods* erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 19040 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Fachrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des estrogenen Potenzials von Wasser und Abwasser mittels eines Reportergergen-Tests mit gentechnisch veränderten Hefestämmen von *Saccharomyces cerevisiae* fest. Dieser Reportergergen-Test beruht auf der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha.

Dieses Verfahren ist anwendbar auf:

- Süßwasser;
- Abwasser;
- wässrige Extrakte und Sickerwasser;
- Eluate von Sedimenten (Süßwasser);
- Porenwasser;
- wässrige Lösungen von Einzelsubstanzen oder von chemischen Gemischen;
- Trinkwasser.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) dieses Verfahrens zur direkten Analyse von Wasserproben liegt zwischen 8 ng/l und 15 ng/l 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Diese Werte wurden in einem internationalen Ringversuch ermittelt (siehe Anhang F). Der obere Schwellenwert des dynamischen Bereichs für diesen Test liegt zwischen 120 ng/l und 160 ng/l 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Proben, die ein estrogenes Potenzial oberhalb dieser Schwelle zeigen, müssen für eine gültige Quantifizierung verdünnt werden. Eine Extraktion und Anreicherung von Wasserproben können notwendig sein, wenn ihr estrogenes Potenzial unter der oben angegebenen Bestimmungsgrenze liegt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 7027, *Water quality — Determination of turbidity*

3 Begriffe

Für die Zwecke dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe und Definitionen.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>