

DIN EN ISO 19040-1



ICS 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser –
Teil 1: Hefe-Estrogenscreening (*Saccharomyces cerevisiae*)
(ISO 19040-1:2018);
Deutsche Fassung EN ISO 19040-1:2022**

Water quality –

Determination of the estrogenic potential of water and waste water –

Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*) (ISO 19040-1:2018);

German version EN ISO 19040-1:2022

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);

Version allemande EN ISO 19040-1:2022

Gesamtumfang 66 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales 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 (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-09 AK „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser — Teil 1: Hefe-Estrogenscreening (*Saccharomyces cerevisiae*) (T 7):

Verfahren DIN EN ISO 19040-1 —T 7

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 6107-6:2004	siehe	DIN ISO 6107-6:2017-11
ISO 7027 (alle Teile)	siehe	DIN EN ISO 7027 (alle Teile)
ISO 7405:2008	siehe	DIN EN ISO 7405:2013-12
ISO 10872:2010	siehe	DIN ISO 10872:2012-10
ISO 11074:2015	siehe	DIN EN ISO 11074:2015-11
ISO 15839:2003	siehe	DIN EN ISO 15839:2007-02
ISO 20079:2005	siehe	DIN EN ISO 20079:2006-12

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

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.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) — gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser — Teil 1:
Hefe-Estrogenscreening (*Saccharomyces cerevisiae*) (T 7).

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

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 7027 (alle Teile), *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung*

DIN EN ISO 7405:2013-12, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2008); Deutsche Fassung EN ISO 7405:2008*

DIN EN ISO 11074:2015-11, *Bodenbeschaffenheit — Wörterbuch (ISO 11074:2015); Dreisprachige Fassung EN ISO 11074:2015*

DIN EN ISO 15088:2009-06, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (ISO 15088:2007); Deutsche Fassung EN ISO 15088:2008*

DIN EN ISO 15839:2007-02, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen (ISO 15839:2003); Deutsche Fassung EN ISO 15839:2006*

DIN EN ISO 20079:2006-12, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005); Deutsche Fassung EN ISO 20079:2006*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 6107-6:2017-11, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 6 (ISO 6107-6:2004); Text Deutsch, Englisch, Französisch und Russisch*

DIN ISO 10872:2012-10, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von Caenorhabditis elegans (Nematoda) (ISO 10872:2010)**

* DIN ISO 10872:2012-10 wurde ersetzt durch DIN EN ISO 10872:2021-12, *Wasserbeschaffenheit und Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von Caenorhabditis elegans (Nematoda) (ISO 10872:2020); Deutsche Fassung EN ISO 10872:2021*

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 résiduelles —
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 Übernachtskultur	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 (G-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 G-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 Fach-einrichtungen 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>

3.1

Leer-Replikat

Leerwert

zusätzliches Replikat, das keine Testorganismen enthält, aber genauso wie die anderen Replikate der Probe behandelt wird

[QUELLE: ISO 10872:2010, 3.5]

3.2

Kulturmedium

flüssige oder verfestigte Nährstoffe, die mikrobielles Wachstum fördern

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 24]

3.3

Verdünnungsstufe

G

Volumenverhältnis einer Mischung von Wasser oder Abwasser (mit dem Zähler 1) und dem Verdünnungswasser als ganze Zahl

Anmerkung 1 zum Begriff: Für unverdünntes Wasser oder Abwasser ist dieser Koeffizient per Definition $1 \rightarrow 1$. Der entsprechende und kleinstmögliche Wert von *G* ist 1. In diesem Dokument zeigt der Pfeil den Übergang vom anfänglichen Gesamtvolumen zum endgültigen Gesamtvolumen an.

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 28]

3.4

Verdünnungswasser

Wasser, welches zur Untersuchungsprobe hinzugegeben wird, um eine Serie definierter Verdünnungen herzustellen

[QUELLE: ISO 20079:2005, 3.7]

3.5

50 % Effektkonzentration

EC_{50}

Konzentration einer Verbindung, die 50 % einer Wirkung verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieses Dokuments ist der EC_{50} die Konzentration einer Verbindung, die 50 % der maximalen Reporterogenaktivität induziert, die durch diese Verbindung erreicht werden kann.

3.6

Feldblindwert

im Labor vorbereiteter mit Wasser oder anderer Blindwertmatrix befüllter Behälter, der durch das Probenahmepersonal während der Probenahme am Ort der Probenahme ausgebracht wird, um mögliche Kontaminationen während der Probenahme zu verifizieren

[QUELLE: ISO 11074:2015, 4.5.3]

3.7

Induktionsrate

Quotient des gemittelten Signals, das nach der Exposition gegenüber einer Konzentration der Probe oder mit einer positiven Kontrolle gemessen wurde und des mittleren Signals, das für die Negativkontrolle unter den gleichen experimentellen Bedingungen gemessen wurde

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiziert — „korrigierte Extinktion“ ersetzt „mutierte Kolonien“; „Wells“ ersetzt „entsprechende Platten“, „Quotient“ ersetzt „Differenz“, „Konzentration“ ersetzt „Dosis“, „Probe“ ersetzt „Testprobe“.]

3.8

Inokulum

Teil einer Kultur von Mikroorganismen die verwendet wird, um eine neue Kultur anzupflanzen oder eine exponentiell wachsende Vorkultur in frischem Medium

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 44]

3.9

Bestimmungsgrenze

LOQ

(en: limit of quantification)

kleinster Wert eines Determinanten, der mit einem vertretbaren Niveau an Genauigkeit und Präzision bestimmt werden kann

[QUELLE: ISO 15839:2003, 3.18]

3.10

geringste nicht wirksame Verdünnung

G-Wert

LID (en: lowest ineffective dilution)

geringste nicht wirksame Verdünnung des Testansatzes, d. h. kein statistisch signifikanter Anstieg der Reporterogenaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle

[QUELLE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiziert — „Anstieg der Reporterogenaktivität“ ersetzt „Zunahme der Anzahl der Reaktionskammern (Wells) mit Wachstum von Revertanten“]

3.11

Negativkontrolle

Verdünnungswasser ohne Probe

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 51]

3.12

Übernachtskultur

Kultur, die nachmittags angesetzt und über Nacht bebrütet wird, um am nächsten Morgen für bestimmte Zwecke, wie Animpfen einer Vorkultur zur Verfügung zu stehen

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verfahren für die Übernachtskultur ist in 9.2 beschrieben.

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 54, modifiziert — gelöscht: „normalerweise ungefähr 16 Stunden“]

3.13

Referenzverbindung

Verbindung mit einem oder mehreren Eigenschaftswerten, die ausreichend reproduzierbar quantifiziert sind, um die Kalibrierung des Messverfahrens zu ermöglichen

[QUELLE: ISO 7405:2008, 3.6, modifiziert — „Verbindung“ ersetzt „Material“; „Kalibrierung des Messverfahrens“ ersetzt „Verwendung des Materials oder Stoffes für die Kalibrierung einer Apparatur, die Bewertung einer Messmethode oder die Zuordnung von Werten zu Materialien“.]

3.14

Reportergenaktivität

quantitative Aktivität eines Gens, das an die Promotorsequenz eines anderen Gens fusioniert ist

3.15

Stammkultur

Kultur einer Organismenart unter Aufbewahrungsbedingungen, die die Bewahrung der ursprünglichen Eigenschaften wie den Nukleotidsequenzen erlauben

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 87]

3.16

Probe

unverdünnter, verdünnter oder anderweitig behandelter Teil einer zu testenden Probe nach Abschluss aller Vorbereitungsschritte wie Zentrifugation, Filtration, Homogenisierung, pH-Einstellung und Bestimmung der Ionenstärke

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 92]

4 Grundlage des Verfahrens

Der Yeast Estrogen Screen (YES) ist ein Reportergen-Test zur Messung der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha (hER α) durch eine Probe, die Estrogenrezeptoragonisten enthält.

Auf diese Weise detektiert der Test die integrale Estrogenaktivität der gesamten Probe in ihrem momentanen Zustand, einschließlich möglicher additiver, synergistischer und antagonistischer Mischungseffekte auf den gesamten Prozess der Reportergenexpression.

Das grundlegende Konzept dieses Tests wird in [10] und [11] erläutert. Das hER α -Gen wird heterolog in der Hefezelle unter Kontrolle eines kupferabhängigen Promotors exprimiert. Der Estrogenrezeptor gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Wenn Agonisten des Estrogenrezeptors in die Hefezelle eintreten, binden sie an den Estrogenrezeptor und induzieren so seine Konformationsänderung. Als Konsequenz bilden zwei Rezeptorproteine ein Rezeptordimer, das in den Zellkern transloziert. Diese Aktivierung des Estrogenrezeptors wird durch die Induktion des Reportergens *lacZ* gemessen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Das *lacZ*-Gen ist mit einem Promotor fusioniert, der durch ein estrogenabhängiges DNA-Elemente (ERE) reguliert und somit durch die Aktivität des Estrogenrezeptors kontrolliert wird. Das ER-Dimer bindet an den Promotor und aktiviert dadurch die Expression der β -Galactosidase. Schließlich wird als Maß für das estrogene Potenzial der Probe die Aktivität der β -Galactosidase unter Verwendung eines geeigneten Substrats bestimmt, das in ein gefärbtes Reaktionsprodukt gespalten wird. Das Reaktionsprodukt kann photometrisch gemessen werden. In Anhang C ist ein Schema des Testprinzips dargestellt.

5 Störungen

Farbige oder trübe Proben können den photometrischen Nachweis der Zelldichte und/oder den Nachweis des Reaktionsproduktes des Reporterenzym β -Galactosidase stören (weitere Informationen siehe Abschnitt 10).

Toxische Effekte der Probe können zu einer Reduktion lebensfähiger Zellen und damit zu einer Verringerung des messbaren Signals führen. Folglich können estrogene Effekte einer Probe durch akute toxische Effekte maskiert werden, was zu falsch negativen Testergebnissen führt (weitere Informationen siehe Abschnitt 10).

Ein hoher Salzgehalt kann aufgrund des resultierenden osmotischen Drucks toxische Effekte verursachen. Die Leitfähigkeit der Probe ist ein Maß für ihren Salzgehalt. Der Teststamm von McDonnell et al. ([10]) toleriert eine Leitfähigkeit der Probe von bis zu 34 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Zur Beurteilung des Bakterienwachstums im Testverlauf dient der Leer-Replikat (3.1). Weitere Informationen in Abschnitt 10.

Wenn zur Entfernung von Bakterien filtrierte Proben getestet werden, werden auch Partikel von der Probe abgetrennt. Substanzen mit estrogener Aktivität, die an Partikel adsorbiert sind, werden dann möglicherweise nicht detektiert.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieses Tests ist eine Kontamination des Puffers, der Medien und aller verwendeten Reagenzien mit estrogen aktiven Verbindungen zu vermeiden, um falsch-positive Testergebnisse auszuschließen.

6 Geräte und Materialien

Geeignete Probenahmegeräte werden in Abschnitt 8 genannt. Übliche Laborgeräte und Glaswaren sind erforderlich. Insbesondere wird folgende Laborausstattung benötigt:

6.1 Schüttelinkubator, temperatur- und zeitgesteuert, $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 pH-Meter.

6.3 Dampfsterilisator.

6.4 Trockensterilisator.

6.5 Zentrifuge, mit einem Rotor für 15 ml und 50 ml Röhrchen bis zu 2 500 g und mit einem Rotor für 96-Well-Platten bis zu 2 500 g.

6.6 Vortex-Schüttler.

6.7 Gefrierschrank, mindestens $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8 Sterilfilter, Celluloseacetat, Porengröße 0,2 μm .

6.9 Impfösen.

6.10 Mehrkanal-Multistepper-Pipette (Repetierpipette).

6.11 Mehrkanalpipetten, 5 μl bis 50 μl und 50 μl bis 300 μl .

6.12 Spektralphotometer.

6.13 Transparente sterile 96-Well-Platten aus Polystyrol für Suspensionskulturen mit flachem Boden und Deckel.

6.14 Mikroplatten-Photometer für 96-Well-Platten, zur Absorptionsmessung bei $540\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ oder $580\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ und bei $600\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$.

6.15 Sterile Werkbank.

6.16 Petrischalen, Durchmesser etwa 94 mm, Höhe etwa 16 mm.

6.17 Kryo-Gefäße, steril, 1 ml, 10 ml.

6.18 Einweg-Nitrilhandschuhe.

6.19 Luftdurchlässige Abdeckfolien für 96-Well-Platten.

7 Reagenzien, Teststamm und Medien

7.1 Reagenzien

Als Reagenzien so weit wie möglich solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwenden.

7.1.1 Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren¹.

7.1.2 α -D-Glucose, wasserfrei, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Molekulargewicht 180,15 g/mol, CAS-Nr.: 50-99-7.

7.1.3 Adenin, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$, Molekulargewicht 135,13 g/mol, CAS-Nr.: 73-24-5.

7.1.4 L-Arginin, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$, Molekulargewicht 174,20 g/mol, CAS-Nr.: 74-79-3.

7.1.5 L-Asparaginsäure, $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$, Molekulargewicht 133,10 g/mol, CAS-Nr.: 56-84-8.

7.1.6 L-Glutaminsäure-Mononatriumsalz Hydrat, $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht (wasserfrei) 169,11 g/mol, CAS-Nr.: 142-47-2 (wasserfreie Basis).

7.1.7 L-Histidin-HCl, $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 209,6 g/mol, CAS-Nr.: 5934-29-2.

7.1.8 L-Isoleucin, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$, Molekulargewicht 131,17 g/mol, CAS-Nr.: 73-32-5.

7.1.9 L-Leucin, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$, Molekulargewicht 131,17 g/mol, CAS-Nr.: 61-90-5.

7.1.10 L-Lysin-HCl, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$, Molekulargewicht 182,65 g/mol, CAS-Nr.: 657-27-2.

7.1.11 L-Methionin, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$, Molekulargewicht 149,21 g/mol, CAS-Nr.: 63-68-3.

7.1.12 L-Phenylalanin, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$, Molekulargewicht 165,19 g/mol, CAS-Nr.: 63-91-2.

7.1.13 L-Serin, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$, Molekulargewicht 105,09 g/mol, CAS-Nr.: 56-45-1.

7.1.14 L-Threonin, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$, Molekulargewicht 119,12 g/mol, CAS-Nr.: 72-19-5.

7.1.15 L-Tyrosin, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Molekulargewicht 181,19 g/mol, CAS-Nr.: 60-18-4.

7.1.16 L-Valin, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$, Molekulargewicht 117,15 g/mol, CAS-Nr.: 72-18-4.

¹ Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren enthält eine Stickstoffquelle wie Ammoniumsulfat, Vitamine und Spurenelemente, die für das Wachstum von Hefezellen benötigt werden. Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäuren wird für die Selektion von Hefestämmen hinsichtlich Kohlenstoffquelle und Aminosäurebedarf benötigt.

- 7.1.17 Kupfer(II)sulfat Pentahydrat**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 249,69 g/mol, CAS-Nr.: 7758-99-8.
- 7.1.18 Ampicillin-Natriumsalz**, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$, Molekulargewicht 371,39 g/mol, CAS-Nr.: 69-52-3.
- 7.1.19 Streptomycin Sulfatsalz**, $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12} \cdot 1,5\text{H}_2\text{SO}_4$, Molekulargewicht 728,69 g/mol, CAS-Nr.: 3810-74-0.
- 7.1.20 Agar für die Mikrobiologie**, $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9)_n$, CAS-Nr.: 9002-18-0.
- 7.1.21 Salzsäurelösung**, 1 mol/l (HCl), Molekulargewicht 36,46 g/mol, CAS-Nr.: 7647-01-0.
- 7.1.22 Natriumhydroxid**, NaOH, Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS-Nr.: 1310-73-2.
- 7.1.23 Ethanol**, $\geq 99,8 \%$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Molekulargewicht 46,07 g/mol, CAS-Nr.: 64-17-5.
- 7.1.24 Glycerin für die Molekularbiologie**, $\geq 99 \%$, $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, Molekulargewicht 92,09 g/mol, CAS-Nr.: 56-81-5.
- 7.1.25 17 β -Estradiol**, $\geq 98\%$, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$, Molekulargewicht 272,38 g/mol, CAS-Nr.: 50-28-2.
- 7.1.26 Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat**, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 177,99 g/mol, CAS-Nr.: 10028-24-7.
- 7.1.27 Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat**, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 137,99 g/mol, CAS-Nr.: 10049-21-5.
- 7.1.28 Kaliumchlorid**, KCl, Molekulargewicht 74,55 g/mol, CAS-Nr.: 7447-40-7.
- 7.1.29 Magnesiumsulfat-Heptahydrat**, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 246,47 g/mol, CAS-Nr.: 10034-99-8.
- 7.1.30 Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (CPRG)**, $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{O}_{10}\text{S}$, Molekulargewicht 585,41 g/mol, CAS-Nr.: 99792-79-7.
- 7.1.31 Lyticase aus *Arthrobacter luteus* — lyophilisiertes Pulver**, $\geq 2\,000$ Units/mg Protein, CAS-Nr.: 37340-57-1.
- 7.1.32 DL-Dithiothreitol**, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$, Molekulargewicht 154,25 g/mol, CAS-Nr.: 3483-12-3.
- 7.1.33 Natriumdodecylsulfat**, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, Molekulargewicht 288,38 g/mol, CAS-Nr.: 151-21-3.
- 7.1.34 Aceton** (puriss p.a.), CH_3COCH_3 , Molekulargewicht 58,08 g/mol, CAS-Nr.: 67-64-1.
- 7.2 Wasser**, Qualität 3 nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ist geeignet.

Wenn nötig, Wasser durch Autoklavieren oder durch Filtration sterilisieren (Celluloseacetat, 0,2 μm). Wasser mit dieser Spezifikation auch für die schrittweise Verdünnung der Probe verwenden.

7.3 Teststamm

Die Herstellung des Teststamms ist in [10] und [11] beschrieben. Der Teststamm ist von dem Stamm *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 (Protease-defizient, MAT α , PEP4::HIS3, prb-1-delta1.6R, HIS3-delta200, lys2-801, trp1-delta101, ura3-52gal2can1) abgeleitet. Dieser Stamm trägt zwei Plasmide. Die Konstruktion dieser Plasmide ist in [10] beschrieben. Das Plasmid YPE10 enthält eine CUP1::hER-Fusion, die den humanen Estrogenrezeptor α aus der humanen MCF-7-Zelllinie unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors CUP1 enthält.

Dieses Plasmid wird über die Tryptophan-Auxothropie des Ausgangsstamms selektioniert. Das zweite Plasmid ist das Reporterplasmid YRPEG3, das das Fusionsgen *2ERE-CYC1::lacZ* enthält. Dieses Fusionsgen exprimiert die β -Galactosidase (kodiert durch *lacZ*) unter der Kontrolle des Iso1cytochrom c-Promotors aus *S. cerevisiae*, der mit zwei Kopien des Vitellogenin-A2-Gens aus *Xenopus laevis* fusioniert ist. Dieses Plasmid wird über die Uracil-Auxothropie des Ausgangsstamms selektioniert.

7.4 Medien

Falls erforderlich, für 20 min bei $121\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ autoklavieren. Die Gefäße lose abdecken (z. B. mit Aluminiumfolie), aber niemals luftdicht verschließen.

7.4.1 10× SD-Medium

67,0 g Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren (7.1.1) und 200 g Glucose (7.1.2) in Wasser (7.2) lösen und mit Wasser (7.2) auf 1 l einstellen. Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilisieren. Die Lösung nicht autoklavieren, da sie Vitamine wie Biotin enthält. Die Lösung in 50 ml Aliquots im Dunkeln bei $\leq -18\text{ °C}$ nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.2 10× McD-DO-Medium (McDonnell)

— 175 mg L-Lysin-HCl (7.1.10); und

— 120 mg L-Histidin-HCl (7.1.7);

in Wasser (7.2) lösen und mit Wasser (7.2) auf 500 ml auffüllen.

Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilisieren. Aliquots je 40 ml im Dunkeln bei $\leq -18\text{ °C}$ nicht länger als sechs Monate aufbewahren.

7.4.3 Glucoselösung

— 144 g α -D-Glucose (7.1.2)

in Wasser (7.2) lösen und mit Wasser (7.2) auf 500 ml auffüllen.

Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilisieren oder autoklavieren und im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.4 CuSO₄-Lösung, 10 mmol/l

250 mg CuSO₄·5H₂O (7.1.17) in Wasser (7.2) lösen und das Endvolumen mit Wasser (7.2) auf 100 ml auffüllen.

Die Lösung autoklavieren. Bei Raumtemperatur die sterile Lösung nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.5 Ampicillin-Stammlösung

1 g Ampicillin-Natriumsalz (7.1.18) in Wasser (7.2) lösen und mit Wasser (7.2) auf 10 ml auffüllen.

Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilisieren und 1 ml Aliquote im Dunkeln bei $\leq -18\text{ °C}$ nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.6 Streptomycin-Stammlösung

1 g Streptomycin Sulfatsalz (7.1.19) in Wasser (7.2) lösen und mit Wasser (7.2) auf 10 ml auffüllen.

Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilisieren und 1 ml Aliquote im Dunkeln bei $\leq -18\text{ °C}$ nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.7 Wachstumsmedium (McDonnell)

- 10 ml 10× SD-Medium (7.4.1); und
- 10 ml 10× McD-DO-Medium (McDonnell, 7.4.2);

unter sterilen Bedingungen zu 80 ml sterilem Wasser (7.2) geben und mischen. Das Medium in 20 ml Aliquote teilen. Das Medium im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als eine Woche oder im Dunkeln bei ≤ −18 °C nicht länger als sechs Monate aufbewahren.

7.4.8 Expositionsmedium (McDonnell)

- 4,2 ml 10× SD-Medium (7.4.1);
- 4,2 ml 10× McD-DO-Medium (7.4.2);
- 1,6 ml Glucose-Lösung (7.4.3);
- 99 µl CuSO₄-Lösung (7.4.4);
- 67 µl Ampicillin-Stammlösung (7.4.5); und
- 67 µl Streptomycin-Stammlösung (7.4.6)

mischen. Das Expositionsmedium unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereiten. Je Platte mit 96 Kavitäten ein Volumen von 5 ml vorbereiten.

7.4.9 Wässrige ethanolische Lösung, Volumenanteil 0,3 %.

300 µl Ethanol (7.1.23) mit sterilem Wasser (7.2) bis zu einem Endvolumen von 100 ml auffüllen.

7.4.10 Wässrige Glycerinlösung, Volumenanteil 30 %.

3 ml Glycerin (7.1.24) mit Wasser (7.2) bis zu einem Endvolumen von 10 ml auffüllen und mischen. Die Lösung durch Filtration (Celluloseacetat, 0,2 µm) sterilisieren oder autoklavieren.

7.4.11 17β-Estradiol (E2) Stammlösung.

50 mg 17β-Estradiol (E2) (7.1.25) in Ethanol (7.1.23) lösen und mit Ethanol (7.1.23) auf 10 ml auffüllen. Die Stammlösung in Aliquoten von 1 ml im Dunkeln bei ≤ −18 °C nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

7.4.12 LacZ-Puffer.

- 10,67 g Na₂HPO₄·2H₂O (7.1.26);
- 0,75 g KCl (7.1.28);
- 0,25 g MgSO₄·7H₂O (7.1.29); und

in 950 ml Wasser (7.2) lösen. Vor der Einstellung des pH-Wertes kann die Lösung trübe sein. Den pH-Wert durch Zugabe von NaH₂PO₄·H₂O (7.1.27) (etwa 5,5 g) auf pH = 7,0 ± 0,2 einstellen.

- 1 g Natriumdodecylsulfat (7.1.33) hinzufügen und lösen.

Mit Wasser (7.2) auf 1 000 ml auffüllen. Die Lösung bei Raumtemperatur nicht länger als sechs Monate aufbewahren.

7.4.13 LacZ-Reaktionsmischung

Zu jeweils 1 ml LacZ-Puffer

- 0,4 mg Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (CPRG) (7.1.30);
- 250 U Lyticase (7.1.31); und
- 0,154 mg DL-Dithiothreitol (7.1.32)

zugeben und lösen.

Für eine 96-Well-Platte werden 6 ml LacZ-Reaktionsgemisch benötigt. Das LacZ-Reaktionsgemisch unmittelbar vor der Verwendung zubereiten.

Verschiedene Chargen der Lyticase können eine unterschiedliche spezifische Lyticase-Aktivität aufweisen. Die Menge an Lyticase, die für die Reaktionsmischung benötigt wird, folgendermaßen berechnen:

$$m_{\text{lyticase}} = \frac{250 \text{ U}}{A_s} \quad (1)$$

Dabei ist

m_{lyticase} die Masse (mg) der Lyticase mit einer spezifischen Aktivität von A_s , die für 1 ml LacZ-Puffer erforderlich ist;

A_s die spezifische Aktivität der Lyticase in U/mg.

8 Probenahme und Proben

8.1 Allgemeines

Dieser Abschnitt beschreibt spezifische Anforderungen an die Probenahme hinsichtlich der Bestimmung estrogener Aktivität in Wasserproben. Allgemeine Informationen zur Probenahme sind in ISO 5667-16 enthalten.

8.2 Flaschen und Probenmaterial

Saubere Glasflaschen (Borosilikatglas) mit Polytetrafluorethylen (PTFE)-beschichteten Verschlusskappen verwenden. Um den photochemischen Abbau von Verbindungen zu vermeiden, Braunglasflaschen verwenden. Falls transparente Glasflaschen verwendet werden, diese in Aluminiumfolie einwickeln oder in einem dunklen Behälter lagern.

Alternativ können Flaschen aus Aluminium oder Edelstahl (beide unbeschichtet) verwendet werden. Es ist sicherzustellen, dass andere Materialien als Borosilikatglas die Ergebnisse nicht beeinflusst.

8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme

Nach der üblichen Reinigung die Flaschen und die Verschlusskappen zusätzlich wie folgt reinigen: saubere Flaschen und die Verschlusskappen dreimal mit einer geringen Menge Aceton (7.1.34) spülen. Das anhaftende Aceton verdampfen lassen (z. B. Trockenschrank). Die Flaschen sofort nach dem Trocknen schließen. Alle Glasgeräte, Spatel usw., die in Kontakt mit der Probe kommen, dreimal mit einer geringen Menge Aceton (7.1.34) spülen. Das anhaftende Aceton verdampfen lassen.