

DIN EN ISO 19040-2



ICS 13.060.70

**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**

Water quality –
Determination of the estrogenic potential of water and waste water –
Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, Arxula adeninivorans) (ISO 19040-2:2018);
German version EN ISO 19040-2:2022

Qualité de l'eau –
Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires –
Partie 2: Test d'oestrogénicité (A-YES, Arxula adeninivorans) (ISO 19040-2:2018);
Version allemande EN ISO 19040-2:2022

Gesamtumfang 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 19040-2:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 19040-2:2022 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 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adeninivorans*) (T 8):

Verfahren DIN EN ISO 19040-2 —T 8

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 7405:2008	siehe	DIN EN ISO 7405:2009-06
ISO 10253:2016	siehe	DIN EN ISO 10253:2018-08
ISO 10872:2010	siehe	DIN ISO 10872:2012-10
ISO 11074:2015	siehe	DIN EN ISO 11074:2015-11
ISO 15839	siehe	DIN EN ISO 15839
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 2:
Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adenivorans*) (T 8).

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 7405:2009-06, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2008); Deutsche Fassung EN ISO 7405:2008*

DIN EN ISO 10253:2018-08, *Wasserbeschaffenheit — Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (ISO 10253:2016); Deutsche Fassung EN ISO 10253:2016*

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, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen*

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 (ISO 5725-2)*

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 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adeninivorans*)
(ISO 19040-2:2018)

Water quality —
Determination of the estrogenic potential
of water and waste water —
Part 2: Yeast estrogen screen
(A-YES, *Arxula adeninivorans*) (ISO 19040-2:2018)

Qualité de l'eau —
Détermination du potentiel oestrogénique
de l'eau et des eaux résiduelles —
Partie 2: Test d'oestrogénicité
(A-YES, *Arxula adeninivorans*) (ISO 19040-2:2018)

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	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 <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) Verfahrenskennndaten	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 β -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 β -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 Probenentrübung	58
K.2.5	Berechnung der Reporterageninduktion	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 G-Werte,
die mit dem *Arxula* Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden 38

Tabelle F.4 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerten 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

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 19040-2:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 19040-2:2022 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 19040-2:2018 wurde von CEN als EN ISO 19040-2:2022 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 Potentials von Wasser und Abwasser mittels eines Reportergergen-Assays mit einem gentechnisch veränderten Hefestamm von *Arxula adeninivorans* fest. Dieser Reportergergen-Assay beruht auf der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha.

Arxula adeninivorans ist ein sehr robuster sowie salz- und temperaturtoleranter Testorganismus, welcher besonders für die Analyse von Proben mit hohem Salzgehalt (Leitfähigkeit bis 70 mS/cm) geeignet ist. Der Testorganismus kann in einem Medium mit einem Natriumchloridgehalt von bis zu 20 % kultiviert werden.

Dieses Verfahren ist anwendbar auf:

- Süßwasser;
- Abwasser;
- Meerwasser;
- Brackwasser;
- 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 1,5 ng/l und 3 ng/l 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Der obere Schwellenwert des dynamischen Bereichs für diesen Test liegt zwischen 25 ng/l und 40 ng/l 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Proben, die estrogenes Potenzial oberhalb dieser Schwelle zeigen, müssen für eine gültige Quantifizierung verdünnt werden. Die Extraktion und Aufkonzentrierung von Wasserproben kann sich als notwendig erweisen, wenn ihr estrogenes Potential unter der angegebenen LOQ liegt.

Es wurde ein internationaler Ringversuch zur Validierung des Verfahrens durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Anhang F zusammengefasst.

ANMERKUNG Eine Extraktion und Aufkonzentrierung von Wasserproben kann sich als notwendig erweisen.

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*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

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

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

EC₅₀

Konzentration einer Verbindung, die 50 % einer Wirkung verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieses Dokuments ist der EC₅₀ 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

Wachstumsrate

Proportionalitätsfaktor für die Zunahme der Zelldichte

[QUELLE: ISO 10253:2006, 3.2]

3.8

Induktionsrate

Quotient des gemittelten Signals derjenigen Vertiefungen einer Platte, bei denen nach Zugabe einer Dosis der Probe die Reportergenaktivität erhöht ist, und dem gemittelten Signal der entsprechenden Vertiefungen, in denen derselbe Stamm unter identischen Bedingungen mit einer Negativkontrolle behandelt worden ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Statt des Signals der Negativkontrolle kann der geschätzte Parameter A des Vier-Parameter-Modells, welches die Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen der Referenzverbindung und der Induktionsrate beschreibt, eingesetzt werden.

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiziert — „Vertiefungen [...] bei denen [...] die Reportergenaktivität erhöht ist“ ersetzt „mutierte Kolonien“; „Wells“ ersetzt „entsprechende Vertiefungen“, „Quotient“ ersetzt „Differenz“.]

3.9

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]

3.10

geringste nicht wirksame Verdünnung Verdünnungsstufe

G-Wert

LID (en: lowest ineffective dilution)

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

[QUELLE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiziert — „Anstieg der Reportergenaktivität“ 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

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“.]

3.13

Reportergenaktivität

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

3.14

Probe

unverdünnter, verdünnter oder anderweitig behandelter Teil einer zu prüfenden 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 A-YES (*Arxula* Yeast Estrogen Screen) ist ein Reporter-Gen-Test für die Messung der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors α (hER α) durch die in der Probe enthaltenen Substanzen, die einen estrogenen Effekt verursachen. Auf diese Weise detektiert der Test die Gesamtheit der estrogenen Aktivität einer Probe in ihrem tatsächlichen Zustand, einschließlich möglicher additiver, synergistischer und antagonistischer Mischungseffekte auf den gesamten Prozess der Reporter-Gen-Expression.

Das Gen für den humanen Estrogenrezeptor α wird unter der Kontrolle des *TEF1*-Promotors konstitutiv in den Hefezellen exprimiert. Der Estrogenrezeptor gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Sobald Estrogenrezeptor-Agonisten in die Hefezellen eindringen, binden sie an das monomere Estrogenrezeptorprotein und induzieren dadurch eine Konformationsänderung. Als Konsequenz bilden zwei Rezeptorproteine ein Rezeptordimer. Diese Aktivierung des Estrogenrezeptors wird durch die Induktion des Reportergens *phyK* gemessen, welches für das Enzym Phytase kodiert. Das *phyK*-Gen ist mit einem estrogenrezeptor-abhängigen Promotor fusioniert, der Estrogen Responsive Elemente (ERE) enthält. Das ER-Dimer bindet an den Promotor und aktiviert dadurch die Expression des *phyK*-Gens und die Sekretion der Phytase. Als Maß für das estrogene Potential wird schließlich die Aktivität der Phytase 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 könnten den photometrischen Nachweis der Zelldichte und/oder den Nachweis des Reaktionsproduktes des Reporterenzym Phytase stören (weitere Informationen siehe Abschnitt 10).

Effekte der Probenmatrix können zu einer Reduktion oder Zunahme lebensfähiger Zellen und zu einer Verringerung oder Zunahme des messbaren Signals führen. Estrogene Effekte einer Probe können durch Matrixeffekte maskiert werden, was zu falsch negativen oder falsch positiven Testergebnissen führt.

Hoher Salzgehalt kann aufgrund des resultierenden osmotischen Drucks toxische Effekte verursachen. Die Leitfähigkeit der Probe ist ein Maß für ihren Salzgehalt. Der Teststamm von *Arxula adenivorans* toleriert einen Salzgehalt von bis zu 20 % Natriumchlorid, was einer Leitfähigkeit der Probe von bis zu 180 mS/cm entspricht.

Das Bakterienwachstum während des Tests wird durch das Leer-Replikat (3.1) beurteilt. Weitere Informationen in Abschnitt 10.

Wenn gefilterte Proben untersucht werden, um Bakterien aus der Probe zu entfernen, werden auch feste Partikel von der Probe abgetrennt. Daher könnten Substanzen mit estrogenen Aktivität, die an Partikel adsorbiert sind, möglicherweise nicht detektiert werden.

Detaillierte Informationen für geeignetes Probenahmematerial, das keinen Einfluss auf das Testergebnis hat, sind in Abschnitt 8 zu finden.

6 Geräte und Materialien

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

6.1 Inkubationsschüttler, temperatur- und zeitgesteuert, 30°C bis 37°C mit einer Fehlergrenze ± 1 °C. mit einem Schüttelorbit von mindestens 3 mm.

Sofern der Schüttler keine Inkubatorfunktion besitzt, einen Schüttler mit einem Schüttelorbit von mindestens 3 mm in Kombination mit einem Brutschrank (6.17) verwenden.

6.2 Minischüttler (Vortexer).

6.3 Multiparametermessgerät für pH-Werte und Leitfähigkeit bzw. separate Messgeräte für jeden Parameter.

6.4 Dampfsterilisator.

6.5 Zentrifuge, mit einem Rotor für 2 ml Röhrchen und mit einem Rotor für 96-Well-Platten, verwendbar bis zu 1 000 g.

6.6 Sterilfilter, Celluloseacetat, Porengröße 0,2 µm.

6.7 Einkanalpipetten, nominales Volumen 10 µl bis 10 000 µl.

6.8 Mehrkanalpipetten, nominales Volumen 100 µl bis 300 µl.

6.9 Transparente 96-Well-Platten aus Polystyrol mit flachem Boden (F-Profil, 300 µl) und Deckel.

6.10 96-Deepwell-Platten mit mindestens 1 ml Volumen, rundem Boden und quadratischer Well-Geometrie.

6.11 Mikrotiterplatten-Photometer für 96-Well-Platten, zur Absorptionsmessung bei Wellenlängen, 405 nm ± 20 nm und 630 nm ± 5 nm oder alternativ 600 nm ± 20 nm.

6.12 Luftdurchlässige Klebefolie für Deepwell-Platten.

6.13 Reaktionsgefäße, 2 ml.

6.14 Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml.

6.15 Pipettierwannen.

6.16 Waage mit einer Mindestlast von 1 mg, d = 0,1 mg.

6.17 Brutschrank 30 °C bis 37 °C mit einer Genauigkeit von ±1 °C. Für den Fall der Kombination eines Schüttlers mit einem Brutschrank ist ein Kühlinkubator erforderlich.

7 Reagenzien, Medien und Teststamm

7.1 Reagenzien

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

7.1.1 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$, Molekulargewicht 36,46 g/mol, CAS-Nr.: 7647-01-0.

7.1.2 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$, Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS-Nr.: 1310-73-2.

7.1.3 Ethanol, ≥ 99,8 %, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Molekulargewicht 46,07 g/mol, CAS-Nr.: 64-17-5.

7.1.4 17β-Estradiol, ≥ 98 %, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$, Molekulargewicht 272,38 g/mol, CAS-Nr.: 50-28-2.

7.1.5 Maltose Monohydrate, > 95 %, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 360,32 g/mol, CAS-Nr.: 6363-53-7.

7.1.6 Natriumnitrat, > 99 %, NaNO_3 , Molekulargewicht 84,98 g/mol, CAS-Nr.: 7631-99-4.

7.1.7 Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99 %, KH_2PO_4 , Molekulargewicht 136,09 g/mol, CAS-Nr.: 7778-77-0.

7.1.8 Magnesiumsulfat, MgSO_4 , Molekulargewicht 120,37 g/mol (wasserfrei), CAS-Nr.: 7487-88-9.

- 7.1.9 Eisen(III)-chlorid Hexahydrat**, > 97 %, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 270,29 g/mol, CAS-Nr.: 10025-77-1.
- 7.1.10 Calciumnitrat**, > 99 %, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Molekulargewicht 164,09 g/mol, CAS-Nr.: 10124-37-5.
- 7.1.11 Calcium D-pantothenat**, > 98 %, $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$, Molekulargewicht 238,27 g/mol, CAS-Nr.: 137-08-6.
- 7.1.12 Thiaminhydrochlorid**, > 98,5 %, $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$, Molekulargewicht 337,27 g/mol, CAS-Nr.: 67-03-8.
- 7.1.13 Niacin**, > 99,5 %, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, Molekulargewicht 123,11 g/mol, CAS-Nr.: 59-67-6.
- 7.1.14 Pyridoxinhydrochlorid**, > 99 %, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$, Molekulargewicht 205,64 g/mol, CAS-Nr.: 58-56-0.
- 7.1.15 D-(+)-Biotin**, $\geq 98,5$ %, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, Molekulargewicht 244,31 g/mol, CAS-Nr.: 58-85-5.
- 7.1.16 Inositol**, ≥ 99 %, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Molekulargewicht 180,16 g/mol, CAS-Nr.: 87-89-8.
- 7.1.17 Borsäure**, > 99,8 %, H_3BO_3 , Molekulargewicht 61,83 g/mol, CAS-Nr.: 10043-35-3.
- 7.1.18 Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat**, > 99,5 %, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 249,68 g/mol, CAS-Nr.: 7758-99-8.
- 7.1.19 Kaliumiodid**, > 99 %, KI , Molekulargewicht 166,00 g/mol, CAS-Nr.: 7681-11-0.
- 7.1.20 Mangansulfat monohydrate**, > 99 %, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 169,02 g/mol, CAS-Nr.: 10034-96-5.
- 7.1.21 Zinksulfat Heptahydrat**, > 99,5 %, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 287,56 g/mol, CAS-Nr.: 7446-20-0.
- 7.1.22 Natriummolybdat Dihydrate**, > 99,5 %, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 241,95 g/mol, CAS-Nr.: 10102-40-6.
- 7.1.23 Cobalt(II)-chlorid**, CoCl_2 , Molekulargewicht 129,84 g/mol, CAS-Nr.: 7646-79-9.
- 7.1.24 Natriumcitrat Dihydrat**, > 99 %, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 294,10 g/mol, CAS-Nr.: 6132-04-3.
- 7.1.25 Citronensäure**, > 99,5 %, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Molekulargewicht 192,12 g/mol, CAS-Nr.: 77-92-9.
- 7.1.26 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP)**, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 371,14 g/mol, CAS-Nr.: 333338-18-4.
- 7.1.27 Natriumhydroxid**, ≥ 99 %, NaOH , Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS-Nr.: 1310-73-2.
- 7.1.28 Meersalz mit den Spezifikationen**: Chlorid (Cl) 19 290 mg/l, Natrium 10 780 mg/l, Sulfat 2 660 mg/l, Kalium 420 mg/l, Calcium 400 mg/l, Carbonat (Bicarbonat) 200 mg/l, Strontium 8,8 mg/l, Bor 5,6 mg/l, Bromid 56 mg/l, Iodid 0,24 mg/l, Lithium 0,3 mg/l, Fluorid 1,0 mg/l, Magnesium 1 320 mg/l.
- 7.1.29 Natriumchlorid**, ≥ 99 %, NaCl , Molekulargewicht 58,44 g/mol, CAS-Nr.: 7647-14-5.
- 7.1.30 Aceton (p.a.)**, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, 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 µS/cm oder Reinstwasser ist geeignet.

Wenn nötig, Wasser (7.2) durch Autoklavieren oder durch Filtration sterilisieren (Celluloseacetat, 0,2 µm).

Wasser mit dieser Spezifikation wird auch für die Herstellung des Verdünnungswassers für die schrittweise Verdünnung der Probe verwenden.

7.3 Teststamm

Der Teststamm leitet sich von *Blastobotrys adeninivorans* G1214 Syn.: *Arxula adeninivorans* G1214 (*aleu2 aura3::ALEU2*) ab, [1]. Dieser Stamm besitzt eine Uracil-Auxotrophie. Um eine unkontrollierte Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen zu vermeiden und um die Akzeptanz hinsichtlich gesetzlicher Anforderungen zu erhöhen, besitzt der Stamm keine Antibiotikaresistenzmarker.

Genetische Beschreibung: Integration des Selektionsmarkers *AURA3mm* in das Plasmid Xplor2-102-hERα-GAA2(ERE107)-phyK nach Austausch des Markers *ALEU2* Promoter-*ATRP1m*. Der Selektionsmarker *AURA3mm* wurde aus dem Plasmid pCR4-AURA3mm-13 isoliert. Die DNA-Sequenzen aus *E. coli* und für die Kanamycinresistenz wurden durch Restriktionsverdau eliminiert. Eine stabile Integration von Xplor2-102-hERα-GAA2(ERE107)-phyK in das *Arxula adeninivorans*-Genom wurde durch Transformation der Kassette in die Uracil-auxotrophe Mutante *A. adeninivorans* G1214 (*aleu2 aura3::ALEU2*) durch homologe Rekombination mit der 25S-rDNA erreicht.

Die Hefezellsuspension zur Bestimmung des estrogenen Potentials wässriger Proben wird aus gefriergetrockneten Zellen hergestellt. Die Gefrieretrocknung der *Arxula adeninivorans*-Zellen ermöglicht eine Testdurchführung unter standardisierten Bedingungen. Es ist keine spezielle Laborausstattung für eine Langzeitkultivierung notwendig.

Die Hefezellen sind kommerziell erhältlich. Die gefriergetrockneten Hefezellen werden zwischen 4 °C und 8 °C entsprechend der Angaben des Herstellers gelagert. Nach der Reaktivierung können die Zellen direkt für den Test eingesetzt werden, Vorkultivierung ist nicht notwendig.

Eine Alternative zu den kommerziellen Hefezellen sind selbst hergestellte gefriergetrocknete Hefezellen. Die Herstellungsprozedur ist im Anhang B beschrieben. Die Hefe kann direkt aus den im Handel erhältlichen Präparaten isoliert werden.

7.4 Medien

Falls notwendig, werden die Medien für 20 min bei 121 °C ± 2 °C autoklaviert. Die Gefäße werden lose bedeckt (z. B. mit Aluminiumfolie). Niemals luftdicht verschließen.

7.4.1 17β-Estradiol (E2) Stammlösung.

10 mg 17β-Estradiol (E2) (7.1.4) in 10 ml Ethanol (7.1.3) lösen. Die 17β-Estradiol (E2) Stammlösung bei ≤ -18 °C nicht länger als 18 Monate lagern.

Sofern verfügbar, kann ein zertifizierter Referenzstandard von 17β-Estradiol der gleichen Konzentration als Stammlösung verwendet werden.

7.4.2 17β-Estradiol (E2) Arbeitslösung.

Die 17β-Estradiol (E2) Stammlösung (7.4.1) wie folgt 1 → 100 verdünnen: 10 µl der 17β-Estradiol (E2) Stammlösung (7.4.1) zu 990 µl Ethanol (7.1.3) hinzufügen und gut mischen. Für die nachfolgende 1 → 10 Verdünnung 100 µl der ersten Verdünnung zu 900 µl Ethanol (7.1.3) hinzufügen und gut mischen. Die finale Konzentration beträgt 1 mg/l. Die Arbeitslösung muss anschließend aliquotiert werden, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Die 17β-Estradiol (E2) Arbeitslösung bei ≤ -18 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

ANMERKUNG Das Pipettieren von organischen Lösungsmitteln erfordert für diesen Zweck kalibrierte Pipetten oder andere geeignete Geräte für das Transferieren dieser Flüssigkeiten.

7.4.3 Maltose-Lösung.

20 g Maltose Monohydrat (7.1.5) in 70 ml Reinstwasser (7.2) lösen und anschließend mit Reinstwasser (7.2) auf 100 ml auffüllen. Die Maltose-Lösung autoklavieren. Die Maltose-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.4 Salz-Lösung für das Hefeminimalmedium.

3,7 g NaNO₃ (7.1.6), 8,4 g KH₂PO₄ (7.1.7) und 1 g MgSO₄ (7.1.8) in 70 ml Reinstwasser (7.2) lösen und anschließend mit Reinstwasser (7.2) auf 100 ml auffüllen. Die Salz-Lösung autoklavieren. Die Salz-Lösung für Hefeminimalmedium bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.5 Salz-Lösung für das salzhaltige Hefeminimalmedium.

28 g NaCl (7.1.29), 3,7 g NaNO₃ (7.1.6), 8,4 g KH₂PO₄ (7.1.7) und 1 g MgSO₄ (7.1.8) in 70 ml Reinstwasser (7.2) lösen und anschließend mit Reinstwasser (7.2) auf 100 ml auffüllen. Für die Analyse von Meerwasser- und Brackwasserproben darf 28 g NaCl durch einen geeigneten Mix aus 28 g Salzen mit einer ähnlichen Zusammensetzung wie Meersalz ersetzt werden. Die Salz-Lösung für das salzhaltige Hefeminimalmedium autoklavieren. Die Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.6 Spurenelement-Lösung.

Die folgenden Chemikalien einzeln einwiegen:

0,05 g H₃BO₃ (7.1.17), 0,01 g CuSO₄ · 5H₂O (7.1.18), 0,01 g KI (7.1.19), 0,04 g MnSO₄ · H₂O (7.1.20), 0,04 g ZnSO₄ · 7H₂O (7.1.21), 0,02 g Na₂MoO₄ · 2H₂O (7.1.22), 0,01 g CoCl₂ (7.1.23).

Die eingewogenen Chemikalien mischen und in 100 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Die Spurenelement-Lösung autoklavieren. Ein leichter Niederschlag in der Spurenelement-Lösung hat keinen Einfluss auf die Qualität. Die Spurenelement-Lösung vor Verwendung gut mischen. Die Spurenelement-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als 12 Monate lagern.

7.4.7 FeCl₃-Lösung.

0,2 g Fe(III)Cl₃ Hexahydrat (7.1.9) in 20 ml Reinstwasser (7.2) lösen und anschließend steril filtrieren (0,2 µm). Die FeCl₃-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.8 Ca(NO₃)₂-Lösung.

10 g Ca(NO₃)₂ (7.1.10) in 10 ml Reinstwasser (7.2) lösen und anschließend steril filtrieren (0,2 µm). Die Ca(NO₃)₂-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.9 Vitamin-Mix.

Die folgenden Chemikalien einzeln einwiegen:

0,2 g Calcium-D-Panθοthenat (7.1.11), 0,2 g Thiamin Hydrochlorid (7.1.12), 0,05 g Niacin (7.1.13), 0,02 g Biotin (7.1.15), 0,2 g Pyridoxin Hydrochlorid (7.1.14), 2 g Inositol (7.1.16).

Die eingewogenen Chemikalien mischen und in 50 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Anschließend den Vitamin-Mix steril filtrieren (0,2 µm). Den Vitamin-Mix bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.10 Hefeminimalmedium mit Maltose.

1 ml FeCl_3 -Lösung (7.4.7), 1 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (7.4.8), 1 ml Spurenelement-Lösung (7.4.6) und 0,5 ml Vitamin-Mix (7.4.9) zu 96,5 ml Salz-Lösung (7.4.4) pipettieren. Anschließend 100 ml Maltose-Lösung (7.4.3) zugeben.

Das Hefeminimalmedium mit Maltose ist fünffach konzentriert. Das Hefeminimalmedium mit Maltose bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.11 salzhaltiges Hefeminimalmedium mit Maltose.

1 ml FeCl_3 -Lösung (7.4.7), 1 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (7.4.8), 1 ml Spurenelement-Lösung (7.4.6) und 0,5 ml Vitamin-Mix (7.4.9) zu 96,5 ml Salz-Lösung für das salzhaltige Hefeminimalmedium (7.4.5) pipettieren. Anschließend 100 ml Maltose-Lösung (7.4.3) zugeben.

Das salzhaltige Hefeminimalmedium mit Maltose ist fünffach konzentriert. Das salzhaltige Hefeminimalmedium mit Maltose bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.12 Substratpuffer.

10,35 g Natriumcitrat Dihydrat (7.1.24) und 12,45 g Citronensäure (7.1.25) einzeln einwiegen. Jede Chemikalie in 60 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Die zwei Lösungen mischen und mit Reinstwasser (7.2) auf 200 ml auffüllen. Den Substratpuffer autoklavieren und vor Verwendung auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Den Substratpuffer bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als sechs Monate lagern.

7.4.13 Phytase-Substratlösung.

Mindestens 15 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (7.1.26) einwiegen und in einem äquivalenten Volumen Substratpuffer lösen. Ein Volumen von 15 ml Phytase-Substratlösung ist ausreichend für zwei Testplatten. Die Phytase-Substratlösung immer frisch herstellen und innerhalb von zwei Stunden verwenden.

7.4.14 Entwickler.

24 g Natriumhydroxid (7.1.27) in 200 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Den Entwickler autoklavieren und vor Verwendung auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Lösung bei Raumtemperatur und nicht länger als sechs Monate lagern.

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 dürfen 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 (7.1.30) 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 (7.1.30) spülen. Das anhaftende Aceton verdampfen lassen.

8.4 Probenahmeverfahren

Während der Probenahme Einweg-Nitrilhandschuhe tragen. Vor der Probenahme keine Handcreme benutzen und Hautkontakt mit der Probe vermeiden. Nur Material aus Glas, PTFE, Aluminium oder Edelstahl verwenden.

Die Flaschen vollständig füllen. Eine mögliche Ausdehnung der Probe aufgrund einer Temperaturänderung berücksichtigen. Wenn die Proben im Rahmen ihrer Konservierung eingefroren werden sollen, dürfen die Flaschen nicht vollständig gefüllt werden. Dies dient dazu, einen Bruch der Flasche zu verhindern, der durch die Volumenzunahme beim Einfrier- und Auftauprozesses entstehen kann.

Die Proben nicht mit Chemikalien stabilisieren.

Die Proben entweder auf 2 °C bis 8 °C kühlen oder bei ≤ -18 °C einfrieren.

8.5 Probentransport

Die Proben so schnell wie möglich nach der Probenahme an das Labor liefern.

Den Probenbehälter frost- und bruchfest transportieren und vor Lichteinwirkung, Temperaturanstieg und äußerer Verschmutzung schützen.

Für längere Transportwege der Probe diese kühlen, oder — bei längeren Zeiten — einfrieren. Die Kühlung sollte so bald wie möglich nach der Probenahme beginnen in Kühlboxen mit Eis, gefrorenen Gelpackungen oder Kühlelementen. Eine Kühlvorrichtung im Transportfahrzeug ist ebenfalls geeignet. Eine Kühltemperatur während des Transports von 2 °C bis 8 °C hat sich als geeignet erwiesen. Die vorgeschlagene Kühltemperatur gilt für die Umgebung der Probe (z. B. in der Kühlbox) und nicht für die Probe selbst.

Wenn die Probe gefroren ist, das Auftauen der Probe vermeiden (z. B. durch Transport auf Trockeneis). Wenn Trockeneis für den Transport ausgewählt wird, sollten die Flaschen in Papier oder Luftpolsterfolie eingewickelt werden, um direkten Kontakt mit dem Trockeneis zu vermeiden.

8.6 Vorbehandlung von Proben

Um den möglichen Verlust partikelbedingter estrogener Aktivität zu vermeiden, unfiltrierte Proben möglichst unmittelbar nach der Probenahme analysieren. Die Entscheidung über eine Probenfiltration (z. B. Celluloseacetat, 0,45 µm Porengröße) muss vom ausführenden Labor in Abhängigkeit der Fragestellung und der Erfahrungen mit dem zu untersuchenden Probentyp gefällt werden. In jedem Fall protokollieren, ob eine gefilterte oder unfiltrierte Probe untersucht wurde. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Filtration auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in [13] und [14].

Die Probe mit HCl (7.1.1) oder NaOH-Lösung (7.1.2) auf einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,2$ einstellen. Die Säure- oder Alkalikonzentration so wählen, dass die zugegebenen Volumina so gering wie möglich sind. Übertitrationen vermeiden. Die HCl-Lösung (7.1.1) oder NaOH-Lösung (7.1.2) wenn notwendig verdünnen. Die Einstellung des pH-Werts der Probe könnte Auswirkungen auf die Probe haben. Alle sichtbaren Veränderungen, die durch die Einstellung des pH-Werts verursacht werden (siehe ISO 5667-16), protokollieren.

Die Leitfähigkeit der Probe messen.

8.7 Lagerung von Proben

Die Proben sofort nach der Probenahme untersuchen. Wenn dies nicht möglich ist, die Wasserproben bei 2 °C bis 8 °C (< 7 d) oder bei Temperaturen unter -18 °C (bis zu zwei Monaten) aufbewahren. Für mehrere Untersuchungen größere Probenvolumina im Voraus in geeignete Portionen aufteilen, da aufgetaute Proben nur am selben Tag angesetzt werden können. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Proben vor der Analyse ver-

meiden. Die Probe im Dunkeln bei einer maximalen Temperatur von 25 °C (z. B. Wasserbad) oder zwischen 2 °C und 8 °C über Nacht auftauen. Zum Auftauen von Proben keine Mikrowelle verwenden.

Die Lagerung der Probe kann sich auf die estrogenen Aktivität der Probe auswirken. Mögliche Änderungen sind probeabhängig. Dauer und Bedingungen für die Probenlagerung auf der Grundlage von Erfahrungen mit dem jeweiligen Probentyp festlegen. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Lagerung auf Proben mit estrogenen Aktivität finden sich in [15] und [16].

9 Testverfahren

9.1 Testansatz

9.1.1 Herstellung der Verdünnungen des Referenzstandards

Die 17 β -Estradiol Arbeitslösung (7.4.2) auftauen. Die Arbeitslösung 1 $\rightarrow$ 100 verdünnen [z. B. 10 μ l 17 β -Estradiol Arbeitslösung (7.4.2) zu 990 μ l Reinstwasser (7.2) zugeben]. Eine weitere 1 $\rightarrow$ 10 Verdünnung herstellen [z. B. 100 μ l der ersten Verdünnung zu 900 μ l Reinstwasser (7.2) pipettieren]. Die Endkonzentration beträgt 1 μ g/l.

Verdünnungsreihe der E2-Referenz: Die Verdünnungen von E2 für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung in braunen Gläschen mit Verschlusskappen und Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Dichtungen herstellen. Tabelle 1 zeigt die Herstellung der E2-Verdünnungen für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Reinstwasser (7.2) für die Verdünnungsreihe verwenden. Für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung werden sieben E2-Konzentrationen eingesetzt (1 ng/l, 2 ng/l, 4 ng/l, 8 ng/l, 20 ng/l, 40 ng/l, 80 ng/l E2). Nach Zugabe der Hefezellsuspension in die Testwells ergeben sich folgende E2-Endkonzentrationen: 0,8 ng/l, 1,6 ng/l, 3,2 ng/l, 6,4 ng/l, 16 ng/l, 32 ng/l, 64 ng/l E2.

Die Gesamtvolumina der E2-Verdünnungen in Tabelle 1 sind ausreichend für eine Testplatte mit zwei Replikaten für jede Verdünnungsstufe (400 μ l je Replikat).

Tabelle 1 — Herstellung der E2-Verdünnungsreihe für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung

E2-Ausgangslösung	Volumen E2-Ausgangslösung	Volumen Wasser	c(E2) finale Lösung	Gesamtvolumen
1 μ g/l	0,56 ml	6,44 ml	80 ng/l	7 ml
80 ng/l	2,5 ml	2,5 ml	40 ng/l	5 ml
40 ng/l	2,5 ml	2,5 ml	20 ng/l	5 ml
20 ng/l	2,0 ml	3,0 ml	8 ng/l	5 ml
8 ng/l	2,5 ml	2,5 ml	4 ng/l	5 ml
4 ng/l	2,5 ml	2,5 ml	2 ng/l	5 ml
2 ng/l	2,5 ml	2,5 ml	1 ng/l	5 ml

9.1.2 Reaktivierung der Hefe

Für eine 96-Well-Testplatte wird ein Fläschchen mit gefriergetrockneter Hefe benötigt.

Vor Verwendung das Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) auf Raumtemperatur bringen. Das Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) 1 $\rightarrow$ 5 verdünnen, indem 8 ml Reinstwasser (7.2) zu 2 ml des Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) zugegeben werden.

Zu dem Gläschen mit der gefriergetrockneten Hefe 2 ml des verdünnten Hefeminimalmediums mit Maltose geben und solange mischen, bis sich das Pellet vollständig gelöst hat (z. B. Verwendung eines Vortexers). Die