

DIN EN ISO 19040-1



ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2022-09-29

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser –
Teil 1: Hefe-Estrogenscreening (*Saccharomyces cerevisiae*)
(ISO 19040-1:2018);
Deutsche und Englische Fassung prEN 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 and English version prEN 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 et anglaise prEN ISO 19040-1:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-07-29 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 121 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 prEN 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) (ISO/TC 147/SC 5/WG 9)“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung (CEN/TC 230, ISO/TC 147)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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 3696	siehe	DIN ISO 3696
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	siehe	DIN EN ISO 7405
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., Telefon 030 2601–2448, 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, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten*

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

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 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

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)*

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)

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	11
7 Reagenzien, Teststamm und Medien	12
7.1 Reagenzien	12
7.2 Wasser, Qualität 3nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 µS/cm ist geeignet.	13
7.3 Teststamm	13
7.4 Medien	13
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)	14
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	15
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	16
8.5 Probentransport	17
8.6 Vorbehandlung der Proben	17
8.7 Lagerung der Proben	17
9 Testverfahren	17
9.1 Herstellung von Kryokulturen für die Langzeitlagerung	17
9.2 Übernachtkultur	18
9.3 Testansatz für wässrige Proben	18
9.3.1 Vorbereitung	18
9.3.2 Herstellung der Referenzverdünnungsreihe	18
9.3.3 Negativkontrolle	20
9.3.4 Leerwert	20
9.3.5 Probenverdünnung	20
9.3.6 Feldblindwert	20
9.3.7 Plattenbelegung	20
9.3.8 Beimpfen der Testplatte	20
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	22
9.6 Berechnung des relativen Wachstums	23

9.7	Bestimmung der EC ₅₀ der Referenzverbindung durch lineare Interpolation	24
10	Gültigkeitskriterien	24
11	Bewertungskriterien	24
12	Testbericht	24
Anhang A (normativ) Stammselektion		26
A.1	Allgemeines	26
A.2	Agarplatten zur Stammselektion	26
A.3	Ausplattieren des Teststamms	26
Anhang B (informativ) Beispiel einer 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 niedrigsten ineffektiven Verdünnungen LID (G-Stufe)	42
F.2.4	Richtigkeit der Ergebnisse	46
Anhang G (informativ) Verwendung anderer Hefestämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		51
G.1	Allgemeines	51
G.2	Teststamm nach Routledge und Sumpter [Literaturhinweis (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 Dosis-Wirkungsbeziehung	56
I.3	Berechnung von 17 β -Estradioläquivalenten für Testproben	57
I.4	Angaben von Estradioläquivalenten für Testproben	57
Anhang J (informativ) Bestimmung der geringsten Abwasserverdünnung ohne Effekt (G-Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung		59
J.1	Allgemeines	59
J.2	Prinzip	59
J.3	Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des G-Wertes	59
J.4	Test zur Bestimmung des G-Wertes	59
J.5	Ergebnisbewertung — G-Wert, Abwässer	59
J.6	Dokumentation der Ergebnisse	59
Literaturhinweise		60

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 niedrigsten ineffektiven Verdünnung (LID) 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 LID-Ergebnisse 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 prEN ISO 19040-1:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

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

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.

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.

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) dieser Methode 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.

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.

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

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 Reportergenaktivität 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 Dosis der Testprobe oder mit einer positiven Kontrolle gemessen wurde und des mittleren Signals, das für die negative Kontrolle 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“.]

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

Quantifizierungsgrenze

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

niedrigste ineffektive Verdünnung

LID, en: Lowest ineffective Dilution/G-Stufe

niedrigste Verdünnung innerhalb einer Testreihe, die keine Wirkung zeigt, d. h. keine statistisch signifikante Zunahme der Reporterogenaktivität verglichen mit der Negativkontrolle

[QUELLE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiziert — „Anstieg der Reporterogenaktivität“ ersetzt „Zunahme der Anzahl von Revertantenwells“.]

3.11

Negativkontrolle

Verdünnungswasser ohne Untersuchungsprobe

[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

Testprobe

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 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 den Literaturhinweisen [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 Testprobe 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. (Literaturhinweis [10]) toleriert eine Leitfähigkeit der Probe von bis zu 34 000 μ S/cm.

Zur Beurteilung des Bakterienwachstums im Testverlauf dient der Leerwert (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, $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 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 $\leq -18\text{ °C}$ und $\leq -70\text{ °C}$.
- 6.8 **Sterilfilter**, Celluloseacetat, Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$.
- 6.9 **Impfösen**.
- 6.10 **Mehrkanal-Multistepper-Pipette (Repetierpipette)**.
- 6.11 **Mehrkanalpipetten**, $5\text{ }\mu\text{l}$ bis $50\text{ }\mu\text{l}$ und $50\text{ }\mu\text{l}$ bis $300\text{ }\mu\text{l}$.
- 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, $C_6H_{12}O_6$, Molekulargewicht 180,15 g/mol, CAS: 50-99-7.

7.1.3 Adenin, $C_5H_5N_5$, Molekulargewicht 135,13 g/mol, CAS: 73-24-5.

7.1.4 L-Arginin, $C_6H_{14}N_4O_2$, Molekulargewicht 174,20 g/mol, CAS: 74-79-3.

7.1.5 L-Asparaginsäure, $C_4H_7NO_4$, Molekulargewicht 133,10 g/mol, CAS: 56-84-8.

7.1.6 L-Glutaminsäure-Mononatriumsalz Hydrat, $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$, Molekulargewicht (wasserfrei) 169,11 g/mol, CAS: 142-47-2 (wasserfreie Basis).

7.1.7 L-Histidin-HCl, $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$, Molekulargewicht 209,6 g/mol, CAS: 5934-29-2.

7.1.8 L-Isoleucin, $C_6H_{13}NO_2$, Molekulargewicht 131,17 g/mol, CAS: 73-32-5.

7.1.9 L-Leucin, $C_6H_{13}NO_2$, Molekulargewicht 131,17 g/mol, CAS: 61-90-5.

7.1.10 L-Lysin-HCl, $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$, Molekulargewicht 182,65 g/mol, CAS: 657-27-2.

7.1.11 L-Methionin, $C_5H_{11}NO_2S$, Molekulargewicht 149,21 g/mol, CAS: 63-68-3.

7.1.12 L-Phenylalanin, $C_9H_{11}NO_2$, Molekulargewicht 165,19 g/mol, CAS: 63-91-2.

7.1.13 L-Serin, $C_3H_7NO_3$, Molekulargewicht 105,09 g/mol, CAS: 56-45-1.

7.1.14 L-Threonin, $C_4H_9NO_3$, Molekulargewicht 119,12 g/mol, CAS: 72-19-5.

7.1.15 L-Tyrosin, $C_9H_{11}NO_3$, Molekulargewicht 181,19 g/mol, CAS: 60-18-4.

7.1.16 L-Valin, $C_5H_{11}NO_2$, Molekulargewicht 117,15 g/mol, CAS: 72-18-4.

7.1.17 Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Molekulargewicht 249,69 g/mol, CAS: 7758-99-8.

7.1.18 Ampicillin-Natriumsalz, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, Molekulargewicht 371,39 g/mol, CAS: 69-52-3.

7.1.19 Streptomycin Sulfatsalz, $C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1,5 H_2SO_4$, Molekulargewicht 728,69 g/mol, CAS: 3810-74-0.

7.1.20 Agar für die Mikrobiologie, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$, CAS: 9002-18-0.

7.1.21 Salzsäurelösung, 1 M (HCl), Molekulargewicht 36,46 g/mol, CAS: 7647-01-0.

7.1.22 Natriumhydroxid, NaOH, Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS: 1310-73-2.

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.

7.1.23 Ethanol, $\geq 99,8\%$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Molekulargewicht 46,07 g/mol, CAS: 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: 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: 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: 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: 10049-21-5.

7.1.28 Kaliumchlorid, KCl, Molekulargewicht 74,55 g/mol, CAS: 7447-40-7.

7.1.29 Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 246,47 g/mol, CAS: 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: 99792-79-7.

7.1.31 Lyticase aus *Arthrobacter luteus* — lyophilisiertes Pulver, $\geq 2\,000$ Units/mg Protein, CAS: 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: 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: 151-21-3.

7.1.34 Aceton (puriss p.a.), CH_3COCH_3 , Molekulargewicht 58,08 g/mol, CAS: 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 Testprobe verwenden.

7.3 Teststamm

Die Herstellung des Teststamms ist in den Literaturhinweisen [10] und [11] beschrieben. Der Teststamm ist von dem Stamm *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 (Protease-defizient, $\text{MAT}\alpha$, $\text{PEP4}::\text{HIS3}$, prb-1-delta1.6R , HIS3-delta200 , lys2-801 , trp1-delta101 , ura3-52gal2can1) abgeleitet. Dieser Stamm trägt zwei Plasmide. Die Konstruktion dieser Plasmide ist in Referenz [10] beschrieben. Das Plasmid YPE10 enthält eine $\text{CUP1}::\text{hER}$ -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 $\text{2ERE-CyC1}::\text{lacZ}$ 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 $121\,^\circ\text{C} \pm 2\,^\circ\text{C}$ 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 µm) sterilisieren. Die Lösung nicht autoklavieren, da sie Vitamine wie Biotin enthält. Die Lösung in 50 ml Aliquots im Dunkeln bei $\leq -18^\circ\text{C}$ 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 µm) sterilisieren. Aliquots je 40 ml im Dunkeln bei $\leq -18^\circ\text{C}$ 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 µm) 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 µm) sterilisieren und 1 ml Aliquote im Dunkeln bei $\leq -18^\circ\text{C}$ 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 µm) sterilisieren und 1 ml Aliquote im Dunkeln bei $\leq -18^\circ\text{C}$ 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 $\leq -18^\circ\text{C}$ 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 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) (etw 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 estrogenen 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.

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 könnte.

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, z. B. 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 der 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 Probenotyp gefällt werden. In jedem Fall protokollieren, ob eine gefilterte oder unfiltrierte Probe getestet wurde. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Filtration auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in den Literaturhinweisen [12] und [13].

Die Probe mit HCl (7.1.21) oder NaOH-Lösung (7.1.22) 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. Übertitrations vermeiden. Die Einstellung des pH-Werts der Probe kann Auswirkungen auf die Probe haben. Alle sichtbaren Veränderungen, die durch die Einstellung des pH-Werts verursacht werden (ISO 5667-16), protokollieren.

8.7 Lagerung der Proben

Die Proben sofort nach der Probenahme testen. 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 Tests 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 vermeiden. 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 estrogene Aktivität der Probe auswirken. Mögliche Änderungen sind probeabhängig. Dauer und Bedingungen für die Probenlagerung auf der Grundlage von Erfahrungen mit dem jeweiligen Probenotyp festlegen. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Lagerung auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in den Literaturhinweisen [14] und [15].

9 Testverfahren

9.1 Herstellung von Kryokulturen für die Langzeitlagerung

Kulturaliquote im Dunkeln bei $-75\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ nicht länger als 12 Monate aufbewahren. Die Zellen nicht in flüssigem Stickstoff lagern, da die Lebensfähigkeit der Zellen unter diesen Bedingungen eingeschränkt ist.

Die optische Dichte der Übernachtskultur (9.2) bei $600\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ (OD600) in einer 1 → 10-Verdünnung mit Wachstumsmedium (7.4.7) messen und die Formazin-Trübungswerte (FAU) für die unverdünnte Kultur nach ISO 7027 berechnen. Die FAU-Kalibrierung bei 600 nm durchführen.

ANMERKUNG Ein FAU-Wert von etwa 1 200 ist eine übliche Zelldichte einer Übernachtskultur und dient als Richtwert für den Anwender. Wenn die Validitätskriterien nach Abschnitt 10 erfüllt sind, sind auch FAU-Werte akzeptabel, die vom Richtwert abweichen.

3,5 ml dieser Übernachtskultur mit 3,5 ml einer sterilen wässrigen Glycerinlösung 30 % (V/V) (7.4.10) unter sterilen Bedingungen mischen. 350 µl-Aliquote der Zellsuspension in Kryoröhrchen bei $-75\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ einfrieren.

Den EC_{50} -Wert der Referenzverbindung 17 β -Estradiol mit einem tiefgekühlt aufbewahrten Aliquot der neuen Kryokultur gemäß dem in 9.3 und 9.4 beschriebenen Standardverfahren bestimmen. Wenn der EC_{50} -Wert, der mit dieser Kryokultur bestimmt wurde, gemäß Abschnitt 10 nicht gültig ist, eine neue Kryokultur herstellen.

9.2 Übernachtskultur

Hefezellen aus einer Kryokultur wie folgt in Wachstumsmedium (7.4.7) kultivieren:

Unter sterilen Bedingungen 5 ml Wachstumsmedium (7.4.7) in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettieren und unmittelbar nach dem Auftauen mit 350 µl Kryokultur (9.1) beimpfen. Den Kolben mit z. B. Alufolie bedecken. Die Übernachtskultur für $22\text{ h} \pm 1\text{ h}$ bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ unter ständigem Schütteln inkubieren. Die Übernachtskultur einen Tag vor der Durchführung des Tests ansetzen. Andere sterile Flaschen oder Behälter können anstelle eines Erlenmeyerkolbens verwendet werden, wenn nachgewiesen wurde, dass diese Änderung die Testqualität nicht beeinträchtigt.

ANMERKUNG 1 5 ml Übernachtskultur sind ausreichend für mindestens 50 Platten mit 96 Vertiefungen.

Die optische Dichte der Kultur nach Inkubation in einer 1 → 10 Verdünnung mit Wachstumsmedium (7.4.7) bei $600\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ messen und die FAU für die unverdünnte Kultur nach ISO 7027 berechnen. Die FAU-Kalibrierung bei 600 nm durchführen.

ANMERKUNG 2 Ein FAU-Wert von etwa 1 200 ist eine übliche Zelldichte einer Übernachtskultur und dient als Richtwert für den Anwender. Wenn die Validitätskriterien nach Abschnitt 10 erfüllt sind, sind auch FAU-Werte akzeptabel, die vom Richtwert abweichen.

9.3 Testansatz für wässrige Proben

9.3.1 Vorbereitung

Das erforderliche Volumen des Expositionsmediums vorbereiten (7.4.8). Es wird ein Volumen von 5 ml je 96-Well-Platte benötigt.

9.3.2 Herstellung der Referenzverdünnungsreihe

Ein Aliquot der 17 β -Estradiol (E2) Stammlösung (7.4.11; 5 mg/ml) auftauen. Die aufgetaute Stammlösung nacheinander zweimal 1 → 100 und einmal 1 → 3 mit Ethanol (z. B. 334 µl E2-Lösung + 666 µl Ethanol) verdünnen. Die resultierende Konzentration beträgt 166,6 µg E2/l. Alle Fläschchen sofort nach Gebrauch schließen, um ein Verdampfen des Ethanols zu vermeiden.

Verdünnungsreihe der E2-Referenz:

Die 166,6 µg/l ethanolische E2-Lösung 1 → 33,3 mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 5 000 ng/l E2 (z. B. 30 µl E2-Lösung auf 970 µl Wasser) verdünnen. Die vorbereitete Lösung von 17 β -Estradiol (166,6 µg E2/l) im Dunkeln bei $\leq -18\text{ °C}$ nicht länger als 12 Monate aufbewahren.

Eine letzte 1 → 10 Verdünnung mit Wasser (7.2) herstellen, z. B. durch Zugabe von 400 µl der 5 000 ng/l E2-Lösung zu 3 600 µl sterilem Wasser (7.2). Die Endkonzentration dieser Lösung ist 500 ng/l E2. Diese Verdünnung in einer Ampulle aus Braunglas mit einer Kappe, die mit PTFE ausgekleidet ist, herstellen.

Aus dieser Lösung sechs aufeinanderfolgende 1 → 3 Verdünnungen mit einer wässrigen Ethanol­lösung [Volumenfraktion 0,3 % (7.4.9)] herstellen, z. B. durch Zugabe von 1 ml der E2-Lösung zu 2 ml der wässrigen Ethanol­lösung. Diese Verdünnungen ebenfalls in Glasfläschchen mit PTFE beschichteten Kappen herstellen. Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der E2-Referenz einen Konzentrationsbereich von 500 ng/l bis 0,66 ng/l E2 verwenden. 160 µl jeder E2-Verdünnung sind ausreichend für eine Testplatte mit zwei Dupli­katen je Verdünnungsstufe. Die folgende Tabelle 1 fasst die Herstellung der E2-Verdünnungsreihe zusammen.

Tabelle 1 — Herstellung der E2-Verdünnungsreihe

E2-Lösung	c(E2)	Volumen- fraktion Ethanol	Verdünnung	Beispiel	Für Konzentrations- Wirkungskurve der Referenz verwendet
1 [Stamm- lösung (7.4.11)]	5 mg/ml	100 %	1 → 100 mit Ethanol	10 µl E2 Lösung 1 + 990 µl Ethanol	
2	50 µg/ml	100 %	1 → 100 mit Ethanol	10 µl E2 Lösung 2 + 990 µl Ethanol	
3	500 µg/l	100 %	1 → 3 mit Ethanol	334 µl E2 Lösung 3 + 666 µl Ethanol	
4	166,6 µg/l	100 %	1 → 33,3 mit Wasser	30 µl E2 Lösung 4 + 970 µl Wasser	
5	5 µg/l	3 %	1 → 10 mit Wasser	400 µl E2 Lösung 5 + 3 600 µl Wasser	
6	500 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 6 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
7	166,6 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 7 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
8	55,6 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 8 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
9	18,5 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 9 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
10	6,2 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 10 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
11	2 ng/l	0,3 %	1 → 3 mit 0,3 % Ethanol	1 ml E2 Lösung 11 + 2 ml 0,3 % Ethanol	x
12	0,66 ng/l	0,3 %			x

ANMERKUNG Nach Zugabe der Hefezellen in die Kavitäten (9.3.7) beträgt die maximale Endkonzentration von E2 333 ng/l. Die Endvolumenfraktion von Ethanol in den Kavitäten mit der Referenzverbindung beträgt 0,2 %. Diese Ethanolkonzentration kann von den Hefezellen toleriert werden und hat keinen Einfluss auf das Testergebnis.

9.3.3 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle (3.11) steriles Wasser (7.2) verwenden. Jede 96-Well-Platte muss mindestens vier Replikate der Negativkontrolle enthalten. Je Replikat ein Volumen von 80 µl verwenden.

9.3.4 Leerwert

Für jede Probe mindestens vier entsprechende Leerwertreplikate (3.1) je 80 µl auf der gleichen 96-Well-Platte mitführen. Die höchste Probenkonzentration für den Leerwert verwenden. Für die Negativkontrolle und die E2-Referenz ist ein Leerwert ausreichend.

9.3.5 Probenverdünnung

Die Probe vor dem Gebrauch durch Schütteln homogenisieren. Sechs aufeinanderfolgende Verdünnungen der Testprobe mit sterilem Wasser (7.2) vorbereiten. Dies führt zu sieben Verdünnungsstufen, die zu testen sind (siehe Beispiel in Anhang E). Mindestens vier Replikate für jede Verdünnungsstufe testen.

9.3.6 Feldblindwert

Den Feldblindwert (3.6) wie die Proben vorbereiten, jedoch ohne weitere Verdünnungen. Für jede Probe am selben Tag einen repräsentativen Feldblindwert parallel bestimmen. Medien, Zellkultur und Instrumentierung müssen dafür mit denen der Probenanalyse identisch sein. Für die Berechnung des Feldblindwerts die Leerwertreplikate der Negativkontrolle verwenden.

Wenn erforderlich, kann der Feldblindwert auch wie eine Probe analysiert werden. In diesem Fall entsprechende Verdünnungen herstellen (9.3.5) und bei der Plattenbelegung Leerwertreplikate berücksichtigen (9.3.7).

Wenn ein Feldblindwert für eine Probenserie repräsentativ ist, muss er nur einmal getestet werden.

9.3.7 Plattenbelegung

Jede Kavität (Probe, Verdünnungen, Negativkontrolle, Feldblindwert, Blindwert) mit einem Volumen von 80 µl befüllen. Jede Probe in sieben Verdünnungsstufen testen. Mindestens vier Replikate jeder Verdünnungsstufe auf derselben 96-Well-Platte untersuchen. Zusätzlich muss die Probenplatte mindestens vier Replikate der Negativkontrolle (9.3.3) enthalten. Wie bereits in (9.3.4) beschrieben, für jede Probe mindestens vier Leerwertreplikate auf derselben 96-Well-Platte testen. Im Falle der Negativkontrolle ist ein Leerwertansatz ausreichend. Auf jeder Platte eine Konzentrations-Wirkungskurve der Referenz 17[17]β-Estradiol (9.3.2) in Duplikaten testen. Insgesamt mindestens vier Replikate der E2-Referenzverdünnungsreihe (9.3.2) parallel testen. Wenn nur eine 96-Well-Platte für den Test verwendet wird, mindestens vier weitere 17β-Estradiol-Verdünnungsreihen (9.3.2) auf einer separaten 96-Well-Platte testen.

Eine empfohlene Plattenbelegung ist in Anhang B dargestellt.

Die Platte innerhalb von 2 h nach der Belegung mit den vorbereiteten Hefezellen (siehe 9.3.8) beimpfen.

9.3.8 Beimpfen der Testplatte

Die Plattenbelegung (9.3.7) vor der Herstellung des Inokulums beenden.

Die FAU der Übernachtskultur auf (250 ± 10) % einstellen. Dies kann nach folgendem Beispiel erfolgen:

Ein Aliquot (z. B. 200 µl) der Übernachtskultur (9.2) 1 → 10 mit Wachstumsmedium (7.4.7) unter sterilen Bedingungen verdünnen. 300 µl in eine Kavität einer 96-Well-Platte pipettieren und die optische Dichte der 1 → 10 Verdünnung bei $600 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ messen. Für die Korrektur des Hintergrunds 300 µl Wachstumsmedium (7.4.7) verwenden. Die FAU der verdünnten Übernachtskultur nach ISO 7027 berechnen. Die FAU-Kalibrierung bei 600 nm durchführen.

Das erforderliche Volumen des 10-fachen Inokulums (resuspendierte Hefezellen mit angepasster FAU für die Exposition) wie folgt berechnen:

$$V_{10\text{-faches Inokulum}} = 0,5 \text{ l} + n \times 0,5 \quad (2)$$

Dabei ist

$V_{10\text{-faches Inokulum}}$ das Volumen des Expositionsmediums (7.4.8) in Millilitern (ml), das für die Herstellung des 10-fachen Inokulums benötigt wird;

n die Anzahl der 96-Well-Platten, die parallel verwendet werden.

Das benötigte Volumen der Übernachtskultur folgendermaßen berechnen:

$$V_{\text{Übernachtskultur}} = \frac{250}{x_{\text{FAU}} \times 10} \times V_{10\text{-faches Inokulum}} \quad (3)$$

Dabei ist

$V_{\text{Übernachtskultur}}$ das Volumen der Übernachtskultur in Millilitern (ml), das benötigt wird, um das 10-fache Inokulum für die Exposition herzustellen;

x_{FAU} der berechnete FAU-Wert der 1 → 10 verdünnten Übernachtskultur;

$V_{10\text{-faches Inokulum}}$ das Volumen des Expositionsmediums (7.4.8) in Millilitern (ml), das für die Herstellung des 10-fachen Inokulums benötigt wird.

Alle folgenden Schritte unter sterilen Bedingungen durchführen. Das berechnete Volumen der Übernachtskultur [Gleichung (3)] in ein neues Teströhrchen überführen und die Hefezellen durch Zentrifugation bei 2 500 g für 10 min pelletieren. Den Überstand verwerfen und die Hefezellen in der erforderlichen Menge an Expositionsmedium (7.4.8) resuspendieren. Zur Qualitätskontrolle die FAU der resultierenden Zellsuspension durch eine Messung der optischen Dichte bei 600 nm ± 20 nm prüfen. Dazu 300 µl der Suspension in einer Kavität einer 96-Well-Platte messen. Zur Korrektur des Hintergrundes das Expositionsmedium verwenden (7.4.8).

Das hergestellte 10-fache Inokulum 1 → 10 mit dem Expositionsmedium (7.4.8) verdünnen, um einen FAU-Wert von 25 einzustellen, z. B. durch Zugabe von 4,5 ml Expositionsmedium (7.4.8) zu 500 µl des 10-fachen Inokulums.

Es wird nicht empfohlen, direkt eine Zellsuspension mit einer FAU von 25 für die Exposition vorzubereiten, da in diesem Fall die Messung des OD600 zu niedrigen Messsignalen führt, die nicht zuverlässig sind.

In alle Kavitäten, die Leerwertwertreplikate enthalten, 40 µl Expositionsmedium (7.4.8) geben. 40 µl der verdünnten Zellsuspension (1-fach Inokulum mit einem FAU-Wert von 25) in alle anderen Kavitäten [Negativkontrolle, Proben und ihre Verdünnungen, Feldblindwerte und die Verdünnungsreihe der Referenzverbindung (E2)] geben.

Die optische Dichte bei 600 nm ± 20 nm messen und die Daten für die nachfolgende Datenauswertung speichern.

ANMERKUNG Diese Messung wird für die Beurteilung eines möglichen Bakterienwachstums im Test benötigt. Eine Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm des Leerwerts der Probe (3.1) während der Exposition zeigt bakterielles Wachstum an.

Um ein Austrocknen zu verhindern, die 96-Well-Platten mit einer gasdurchlässigen Folie (6.19) abkleben. Den Inhalt jeder 96-Well-Platte durch kräftiges Schütteln für etwa 30 s mischen. Das Verschütten von Kulturmedium während des Schüttelns vermeiden. Jedes Labor muss eine geeignete, von der Art des Schüttlers abhängige Rotationsgeschwindigkeit festlegen.

Den Testansatz bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ ohne Schütteln inkubieren. Die 96-Well-Platten dabei nicht mit einem Plastikdeckel abdecken. 96-Well-Platten nicht stapeln.

9.4 Messung

9.4.1 Messung der Zelldichte

Durch kräftiges Schütteln oder Auf- und Abpipettieren die Hefezellen nach der Inkubation von 18 h gründlich resuspendieren. Für die Bestimmung von Wachstumshemmung und/oder zytotoxischen Effekten die Zelldichte bei $600\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ messen.

Eine gute Resuspension der Hefezellen ist entscheidend für das Testverfahren. Ohne homogen resuspendierte Zellen sind die Messung bei 600 nm und die Messung der Reportergenaktivität sehr fehleranfällig und werden höchstwahrscheinlich zu ungünstigen Testergebnissen führen.

9.4.2 Messung der Reportergenaktivität

Von jeder Kavität der Testplatte 30 µl auf eine neue 96-Well-Platteüberführen. 50 µl der lacZ-Reaktionsmischung (7.4.13) zu jeder Kavität hinzugeben. Die optische Dichte bei $580\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ messen. Anschließend die Platte für 1 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ unter ständigem Schütteln inkubieren. Aufgrund der Aktivität des zugesetzten Enzyms Lyticase werden die Hefezellen während dieser Inkubation lysiert. Die Zellyse durch eine optische Kontrolle überprüfen. Wenn die Proben trübe sind, die verbleibenden Hefezellen und Zelltrümmer bei 4 000 g für 10 min abzentrifugieren. Zur Messung der Reportergenaktivität 60 µl des geklärten Überstands auf eine neue 96-Well-Platte überführen.

Eventuell vorhandene Luftblasen in den Kavitäten vor der Messung der optischen Dichte z. B. durch den Luftstrom eines Föns entfernen.

Die optische Dichte bei $580\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ messen.

Wenn die Messung bei $580\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ den linearen Bereich des Photometers überschreitet, die Messung bei $540\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ wiederholen.

Die erste Messung bei 580 nm wird für die Bewertung einer möglichen artifiziellen Spaltung des Substrats CPRG durch Inhaltsstoffe der getesteten Probe benötigt. Eine Zunahme der optischen Dichte bei 580 nm in den Leerwertansätzen der Probe (3.1) während der Inkubation zeigt eine artifizielle Spaltung des Substrats an.

Häufig sind Photometer mit einem Filter für die Messung bei 540 nm statt 580 nm ausgestattet. Wenn die Messung der Reportergenaktivität bei 540 nm durchgeführt werden muss, wird empfohlen, die Volumina zu verdoppeln, d. h. 60 µl der exponierten Zellen mit 100 µl der lacZ-Reaktionsmischung (7.4.13) versetzen.

9.5 Berechnung der korrigierten Extinktion und der Reportergeninduktion

Die korrigierte Extinktion (A_C) für alle Verdünnungen der Proben (SD), alle Verdünnungen der Referenzverbindung (RD), die Negativkontrolle (NC) und den Feldblindwert nach Gleichung (4) berechnen.

$$A_C(i) = \frac{(A_{580}(i) - \overline{B_{580}}(i))}{(A_{600}(i) - \overline{B_{600}}(i))} \quad (4)$$

Dabei ist

$A_C(i)$ die korrigierte Extinktion für Test i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC);

$A_{580}(i)$ die Extinktion bei 580 nm für Test i ;

$\overline{B}_{580}(i)$ die mittlere Extinktion bei 580 nm für Leerwertproben des Tests i ;

$A_{600}(i)$ die Extinktion bei 600 nm für Test i ;

$\overline{B}_{600}(i)$ die mittlere Extinktion bei 600 nm für Leerwertproben des Tests i .

Der mittlere Wert für AC für die Negativkontrolle (NC), den Feldblindwert und alle getesteten Verdünnungen der Probe und der Referenzverbindung (E2-Verdünnungsreihe) sowie die jeweilige Standardabweichung [σ (i)] berechnen. Für die Bewertung der Testergebnisse diese Mittelwerte verwenden. Die mittlere korrigierte Extinktion für die nachfolgende statistische Auswertung und die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve verwenden.

Die Induktionsrate (I) des Tests mit der maximalen E2-Konzentration der E2-Verdünnungsreihe (9.3.2) nach Gleichung (5) berechnen. Die Induktionsrate ist ein Maß für die Induktion des Estrogenrezeptors in dem Test im Vergleich zur Basalaktivität des Rezeptors, die mit der Negativkontrolle bestimmt wird. Ein Wert für eine gültige minimale Induktionsrate ist in Abschnitt 10 angegeben.

$$q_I(E2_{\max}) = \frac{\overline{A}_c(E2_{\max})}{\overline{A}_c(NC)} \quad (5)$$

Dabei ist

$q_I(E2_{\max})$ die Induktionsrate des Tests mit der höchsten E2-Konzentration der E2-Verdünnungsreihe (9.3.2);

$\overline{A}_c(E2_{\max})$ der Mittelwert der korrigierten Extinktion der beiden Expositionen mit der höchsten E2-Konzentration innerhalb der E2-Verdünnungsreihe nach Gleichung (4);

$\overline{A}_c(NC)$ der Mittelwert der korrigierten Extinktionen der Negativkontrollreplikate.

9.6 Berechnung des relativen Wachstums

Das relative Wachstum $G(i)$ berechnen, um mögliche toxische Wirkungen der Probe zu bewerten. Wenn die akute Toxizität der Probe zu stark ist, können estrogene Effekte maskiert und daher nicht quantifiziert werden (siehe Abschnitt 10 für weitere Details). Das relative Wachstum $G(i)$ berechnen nach:

$$G(i) = \frac{(A_{600}(i) - \overline{B}_{600}(i))}{(A_{600}(NC) - \overline{B}_{600}(NC))} \quad (6)$$

Dabei ist:

$G(i)$ das relative Wachstum von Test i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Positivkontrolle PC);

$A_{600}(i)$ die Extinktion bei 600 nm für Test i ;

$\overline{B}_{600}(i)$ die mittlere Extinktion bei 600 nm für Leerwertproben des Tests i ;

$A_{600}(NC)$ die Extinktion bei 600 nm für die Negativkontrolle;

$\overline{B}_{600}(NC)$ die mittlere Extinktion bei 600 nm für Leerwertproben der Negativkontrolle.

9.7 Bestimmung der EC₅₀ der Referenzverbindung durch lineare Interpolation

Die EC₅₀ der 17 β -Estradiol-Konzentrations-Wirkungs-Kurve durch eine geeignete statistische Methode wie Probit-Analyse, gleitendem Durchschnitt oder einer binomialen Methoden (siehe Literaturhinweise [16] und [17]) bestimmen.

Eine grafische Abschätzung über ein Gauß-Logarithmusdiagramm siehe Literaturhinweis [18].

10 Gültigkeitskriterien

Der Gesamttest ist gültig, wenn:

- a) der aus der 17 β -Estradiol-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung abgeleitete EC₅₀ von 17 β -Estradiol zwischen 39 ng/l und 107 ng/l liegt;
- b) die mittlere korrigierte Extinktion der Negativkontrollen im Bereich von 0,05 bis 1,5 liegt;
- c) die relative Standardabweichung der korrigierten Extinktion der Negativkontrollen < 30 % beträgt;
- d) die durch die höchste E2-Konzentration hervorgerufene Induktionsrate (9.5) > 10 ist;
- e) die mittlere OD 600 der Blindprobe (3.1) nach der Exposition nicht höher als der jeweilige Wert vor der Exposition ist (t-Test mit $\alpha = 0,05$);
- f) die mittlere OD 580 der Blindprobe (3.1) nach Messung der Reportergenaktivität (9.4.2) nicht höher als der jeweilige Wert vor der Messung ist (t-Test mit $\alpha = 0,05$). Ansonsten könnte eine künstliche Spaltung des Substrats vorliegen. In diesem Fall ist das Testverfahren für die vorliegende Probe nicht geeignet.

Eine Verdünnungsstufe einer Probe ist gültig, wenn:

- a) das relative Wachstum von Hefezellen in dieser Verdünnungsstufe der Probe > 0,7 und < 1,3 beträgt;
- b) die relative Standardabweichung der korrigierten Extinktion zwischen den vier Replikaten < 15 % (Interwell-Abweichung) beträgt.

11 Bewertungskriterien

Nach den Bedingungen dieses Testverfahrens hat eine Testprobe eine estrogene Aktivität, wenn ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der Reportergenaktivierung gemessen wird, der die Reportergenaktivität im Feldblindwert signifikant übersteigt.

Ein Beispiel für eine statistische Bewertung enthält Anhang H.

12 Testbericht

Der Testbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- a) die verwendete Testmethode unter Bezugnahme auf dieses Dokument, d. h. ISO 19040-1:2018;
- b) Identität der Testprobe (Herkunft und Datum der Probenahme, pH-Wert, Leitfähigkeit);
- c) Referenzverbindung (chemische Bezeichnung, Quelle, Chargennummer oder vergleichbare Daten, falls verfügbar);
- d) Lagerung der Probe und Vorbereitung der Testprobe (Lagerbedingungen (falls nicht direkt getestet), Einstellung des pH-Werts, Zentrifugation (einschließlich g und Zeit), Filtration (einschließlich Filtermaterial und Porengröße) und andere Veränderungen an der Probe);

- e) Teststamm (Stamm, Quelle, Datum der Ankunft im Labor, Lagerungsbedingungen, Datum der Stammkulturherstellung und Datum der Genotypkontrolle (wenn dieses Datum von der Stammkulturherstellung abweicht), ursprüngliche FAU der Übernachtskultur, angepasste FAU des Inokulums;
- f) Testumgebung (Adresse des Testlabors, Datum der Prüfung, Art des verwendeten Photometers);
- g) Testergebnisse (mittlere korrigierte Extinktion für Feldblindwert und jede getestete Proben- und Referenzverdünnung mit Standardabweichung, qualitative Bewertung der Estrogenität der Probe (ja/nein) mit Angaben zur statistischen Auswertung, Angabe toxischer Wirkungen (falls vorhanden), andere Beobachtungen (z. B. Präzipitation, Kontamination der Probe). Wenn 17β -Estradioläquivalente (EEQ) für die Proben oder Probenverdünnungen berechnet werden, ist eine weitere Berichterstattung nach Anhang I erforderlich. Wenn G-Werte berechnet werden, ist eine weitere Berichterstattung nach Anhang J erforderlich.

Anhang A (normativ)

Stammselektion

A.1 Allgemeines

Anhang A beschreibt das Verfahren zur Selektion des Teststammes *S. cerevisiae*.

A.2 Agarplatten zur Stammselektion

2 g Agar (7.1.20) in 78 ml Wassersuspendieren.

Nach Zugabe eines Magnetrührers die Suspension für 20 min bei $121\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ autoklavieren.

Die Lösung auf 50 °C bis 60 °C abkühlen und unter sterilen Bedingungen Folgende Lösungen zugegeben:

- 10 ml 10× SD-Medium (7.4.1);
- 10 ml 10× McD-DO-Medium (7.4.2).

Die Lösung vorsichtig mischen, dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.

Etwa 20 ml der Lösung unter sterilen Bedingungen in eine Petrischale (9 cm) geben. Die so hergestellten Agarplatten über Nacht abkühlen lassen.

A.3 Ausplattieren des Teststamms

Zur Stammselektion eine aufgetaute Stammkultur in einer mit Wachstumsmedium (7.4.7) hergestellten 1 → 100-Verdünnung auf einer Agarplatte ausstreichen (A.2) und die Platte über Nacht bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubieren. Eine einzelne Kolonie auswählen und mit 5 ml des Wachstumsmediums (7.4.7) für 18 h über Nacht bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ unter kräftigem Schütteln kultivieren. Diese Kultur zur Herstellung von Stammkulturen, wie in (9.1) beschrieben, verwenden.

Anhang B
(informativ)

Beispiel einer Testplattenbelegung

Anhang B zeigt ein Beispiel für eine geeignete Plattenbelegung für den YES.

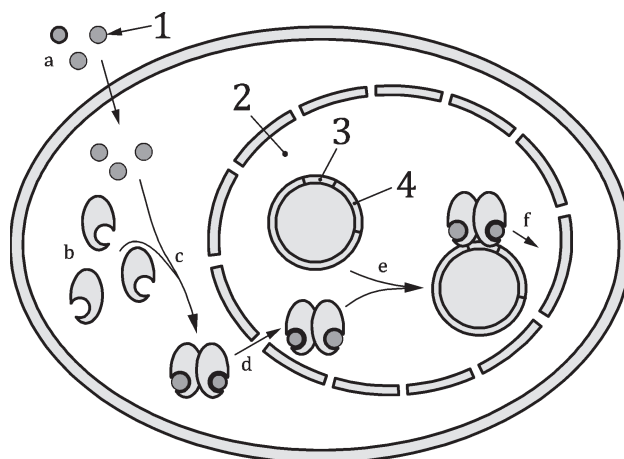
Tabelle B.1 — Belegung mit zwei Proben und sieben aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen mit vier Replikaten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E2, 0,66 ng/l	Negativ- kon- trolle	Probe 1 (Verdünnungsstufe 12)				Feldblind- wert 1	Probe 2 (Verdünnungsstufe 12)				E2, 0,66 ng/l
B	E2, 2,0 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 8)					Probe 2 (Verdünnungsstufe 8)				E2, 2,0 ng/l
C	E2, 6,2 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 6)					Probe 2 (Verdünnungsstufe 6)				E2, 6,2 ng/l
D	E2, 18,6 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 4)					Probe 2 (Verdünnungsstufe 4)				E2, 18,6 ng/l
E	E2, 55,6 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 3)				Feldblind- wert 2	Probe 2 (Verdünnungsstufe 3)				E2, 55,6 ng/l
F	E2, 166,6 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 2)					Probe 2 (Verdünnungsstufe 2)				E2, 166,6 ng/l
G	E2, 500 ng/l		Probe 1 (Verdünnungsstufe 1)					Probe 2 (Verdünnungsstufe 1)				E2, 500 ng/l
H	Leerwert (E2, 500 ng/l)	Leer- wert NC	Leerwert Probe 1 (unverdünnt)					Leerwert Probe 2 (unverdünnt)				Leerwert (E2, 500 ng/l)

Anhang C (informativ)

Schema des Testprinzips

Anhang C veranschaulicht das zugrundeliegende Testprinzip des YES. Siehe Bild C.1.



Legende

- 1 ER-Agonist
- 2 Zellkern
- 3 ERE
- 4 Reportergen

- ^a Der ER-Agonist (XenoEstrogen) diffundiert in die Hefezelle.
- ^b Der menschliche Estrogenrezeptor alpha (hER α) wird heterolog exprimiert [z. B. über ein Plasmid, das das jeweilige Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (nicht gezeigt) enthält].
- ^c Der ER-Agonist bindet an den Estrogenrezeptor und induziert eine Dimerisierung von hER α .
- ^d Aufgrund der Rezeptorbindung und Dimerisierung wird ein Kernlokalisierungssignal exponiert und das Dimer in den Zellkern transloziert.
- ^e Das Rezeptordimer bindet und aktiviert einen Promotor, der ein auf Estrogen ansprechendes Element (ERE) enthält. Das Reporterkonstrukt kann in das Hefegenom integriert oder, wie hier gezeigt, Teil eines Plasmids sein.
- ^f Die Expression des Reportergens ist proportional zur Aktivierung des hER α durch die (Xeno)Estrogene.

Bild C.1 — Grundlegendes Testprinzip des YES

Anhang D (informativ)

Testung von Chemikalien und Extrakten

D.1 Allgemeines

Für die Analyse bestimmter Matrices wie Oberflächenwasser oder Trinkwasser müssen die Proben durch Extraktionsverfahren angereichert werden. Anhang D enthält Informationen über mögliche Extraktionsverfahren und die Änderungen im Verfahren zur Prüfung von Extrakten und Chemikalien.

D.2 Extraktion von Wasserproben

Extrakte von Wasserproben können mit den folgenden Anpassungen des Verfahrens getestet werden. Wasserproben werden mit Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) oder Festphasenextraktion (SPE) extrahiert; beide Methoden zeigen im Allgemeinen hohe (> 90 %) Wiederfindungsraten für bekannte (Xeno)Estrogene. Bei der Verwendung von LLE die Wasserprobe dreimal mit Ethylacetat extrahieren, dabei etwa 10 % des Probenvolumens als Volumen des Extraktionslösungsmittels verwenden. Bei SPE geeignete Säulen, z. B. Oasis HLB oder C18 verwenden und mit Methanol oder Ethylacetat eluieren. Die Extrakte vorzugsweise in Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen, alternativ Ethanol verwenden. Referenzkonzentrationen für die Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels wie für die Proben herstellen.

D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten

Das Verfahren ist identisch mit der Beschreibung in Abschnitt 9 mit folgenden Ausnahmen:

Für Extraktionsverfahren oder die Herstellung von organischen Lösungen von Chemikalien wird Ethanol, Methanol oder DMSO als organisches Lösungsmittel verwendet. Eine wässrige Verdünnung des organischen Extrakts oder der organischen Lösung so herstellen, dass der maximale Volumenanteil des organischen Lösungsmittels 1 % beträgt.

Eine wässrige Lösung mit dem gleichen Volumenanteil des organischen Lösungsmittels verwenden:

- zur Herstellung der Verdünnungsreihe der Probe;
- für die Negativkontrolle;
- zur Herstellung der E2-Referenz und der Verdünnungsreihe der E2-Referenz.

80 µl der wässrigen organischen Lösung in jede Kavität pipettieren und 40 µl der vorbereiteten Zellsuspension (9.3.8) hinzugeben. Dies gilt für die Negativkontrolle, die Verdünnungsreihe der Probe, die Verdünnungsreihe der Referenzverbindung und den Feldblindwert. Zur Präparation des Feldblindwerts das gleiche Verfahren und die gleichen Materialien wie für die Herstellung des Probenextrakts oder einer organischen Lösung einer Chemikalie verwenden.

D.4 Direktes Testen von organischen Lösungen oder Extrakten

Das Verfahren ist identisch mit der Beschreibung in Abschnitt 9 mit folgenden Ausnahmen:

Für Extraktionsverfahren oder die Herstellung von organischen Lösungen von Chemikalien werden Ethanol oder Methanol als organisches Lösungsmittel verwendet. Organische Lösungen oder Extrakte können direkt zu dem organischen Lösungsmittel auf der 96-Well-Platte gegeben und damit verdünnt werden, wobei Volumina zwischen 20 µl und 80 µl je Kavität verwendet werden. Ein Beispiel mit 40 µl organischer Lösung oder Extrakt je

Kavität einer 96-Well-Platte wird nachstehend unter Verwendung einer Plattenbelegung analog zu Tabelle B.1, gezeigt.

Spalte 2 enthält 40 µl des organischen Lösungsmittels und dient als Negativkontrolle. Spalte 7 enthält 40 µl des Feldblindwerts.

In den Spalten 3 bis 6 und 8 bis 11 enthält jede Kavität in den Reihen B bis H 40 µl organisches Lösungsmittel. 40 µl organische Lösung oder Extrakt in die Reihen A und B pipettieren. Die 80 µl Probenverdünnung in der Reihe B durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren von 40 µl mischen. Anschließend 40 µl von der Reihe B in die Reihe C überführen, erneut mischen und in die Reihe D usw. übertragen. Am Ende der Verdünnungsreihe 40 µl aus der Reihe H verwerfen. Mit diesem Vorgehen wird eine 1 → 2 Verdünnungsreihe erzeugt.

Zur Herstellung der E2-Referenz die 83,3 µg/l ethanolische E2-Lösung (9.3.2) verwenden und 40-fach mit dem organischen Lösungsmittel (z. B. 20 µl E2-Lösung zu 780 µl organischem Lösungsmittel) auf 2,08 µg/l verdünnen. 100 µl organisches Lösungsmittel in jede der 8 Kavitäten einer separaten 96-Well-Platte pipettieren. 100 µl der 2,08 µg/l E2-Lösung zur ersten Kavität hinzupipettieren und über 7 Kavitäten eine 1 → 2-Verdünnungsreihe herstellen. 20 µl der Verdünnungsreihe auf die Platte pipettieren, d. h. in die Spalten 1 und 12 über die Reihen A bis G. Das für die E2-Referenz verwendete Volumen (d. h. 20 µl je Kavität) auf das Volumen der organischen Lösungen oder des Extrakts abstimmen (d. h. im Bereich von 20 µl bis 80 µl). Im obigen Beispiel mit 40 µl organischer Lösung oder Extrakt zusätzlich 20 µl organisches Lösungsmittel in jede Kavität der E2-Referenzverdünnungsreihe geben.

Das organische Lösungsmittel unter sterilen Bedingungen abdampfen. 80 µl steriles Wasser (7.2) und 40 µl der Zellsuspension (9.3.8) zur Negativkontrolle, den Probenverdünnungen, der Verdünnungsreihe der Referenzverbindung und dem Feldblindwert hinzugeben. Um das Austrocknen des Tests zu verhindern, die 96-Well-Platte mit einer gasdurchlässigen Folie abkleben. Die Proben durch kräftiges Schütteln für 2 min rüchlösen (das Verschütten von Kulturmedium während des Schüttelns vermieden).

ANMERKUNG Die Art und Weise, in der eine Probe auf die Platte übertragen wird (als wässrige Probe, verdünnter Extrakt oder erneut gelöster Extrakt), kann die Ergebnisse beeinflussen (siehe Referenzen [19] und [20]).

D.5 Daten aus der Literatur

Das Estrogene Potential einer Verbindung wird häufig als relative Potenz im Vergleich zur Referenzverbindung 17β-Estradiol ausgedrückt. Die relative Potenz (%) wird wie folgt berechnet:

$$P_r = \frac{EC_{50}(R)}{EC_{50}(C)} \times 100 \quad (D.1)$$

Dabei ist

P_r die Potenz einer Verbindung C relativ zu einer Referenzverbindung R (z. B. 17β-Estradiol) in Prozent;

$EC_{50}(R)$ der EC50 der Referenzverbindung 17β-Estradiol;

$EC_{50}(C)$ der EC50 der Verbindung.

Tabelle D.1 zeigt die relativen Potenzen zu 17β-Estradiol für ausgewählte Verbindungen zusammen mit dem jeweiligen Literaturzitat.

Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen im Vergleich zu 17 β -Estradiol für ausgewählte Verbindungen

Verbindung	Relative Potenz (P_r) im Vergleich zu 17 β -Estradiol (%)	Literatur
17 α -Estradiol	5,25	[21]
17 β -Ethinylestradiol	88,8	[21]
17 β -Estradiol	100	[21]
17 β -Estradiol-3(beta-D-Glucuronid)	0,32	[21]
17 β -Estradiol-3-Glucuronide-17-Sulfat	0	[21]
17 β -Estradiol-3-Sulfat	0,01	[21]
2',3',4',5'-Tetrachlor-4-Biphenylol	0,82	[21]
2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin	0,26	[21]
2',4',6'-Trichlor-4-Biphenylol	1	[21]
2',5'-Dichlor-4-bBiphenylol	0,62	[21]
2'-Chlor-4-Biphenylol	0,003 7	[21]
2-tert-Butylphenol	0,000 218 06	[22]
3,3',5,5'-Tetrachlor-4-4'-Biphenyidiol	0,016	[21]
4'-Chlor-4-Biphenylol	0,06	[21]
4-Hydroxytamoxifen	0,007 3	[21]
4-Nonylphenol (straight chain)	0,002 2	[21]
4-Nonylphenol (technical grade)	0,005	[21]
4-Octylphenol	0,003	[21]
4-tert-Butylphenol	0,004 617 65	[22]
4-tert-Octylphenol	0,000 36	[21]
α -Zearalanol (zearanol)	1,3	[21]
α -Zearalenol	8,7	[21]
Androstenediol	0,023	[21]
Androstendion	0	[21]
β -Sitosterol	0,000 45	[23]
β -Zearalanol	0,46	[21]
β -Zearalenol	0,066	[21]
Bis(2-ethylhexyl)phthalate	0	[21]
Bisphenol A	0,005	[21]
Bochanin A	0,009 1	[21]
Butylbenzylphthalat	0,000 4	[21]
Butylhydroxytoluol	0	[21]
Chlorphen	0,009 9	[21]
Cholesterol	0	[21]
Clomiphen	0,002 3	[23]
Cortisol	0	[21]

Tabelle D.1 (fortgesetzt)

Verbindung	Relative Potenz (P_r) im Vergleich zu 17β-Estradiol (%)	Literatur
Coumestrol	0,67	[21]
Daidzein	0,001 3	[21]
DDT	0,000 03	[21]
Dehydroepiandrosteron	0,001 8	[21]
Dienestrol	25,4	[21]
Diethylstilbestrol	74,3	[21]
Dihydrotestosteron	0,05	[23]
Di- <i>n</i> -Butylphthalat	0	[21]
D-Norgestrel	0,000 4	[21]
Equol	0,085	[21]
Estriol	0,63	[21]
Estron	9,6	[21]
Formononetin	0,005 6	[21]
Genistein	0,049	[21]
Hexestrol	30,6	[21]
ICI 164,384	0,001 6	[23]
ICI 164,384	0,001 6	[23]
Mestranol	7,3	[21]
Methoxychlor	0,003 3	[21]
Nafoxidin	0	[21]
o,p'-DDD	0,000 006 7	[23]
o',p'-DDE	0,000 04	[21]
o',p'-DDT	0,000 11	[21]
Progesteron	0	[21]
Stigmasterol	0,000 22	[22]
Tamoxifen	0,004 7	[21]
Testosteron	0,001	[21]
Zearalenon	0,26	[21]

Anhang E
(informativ)

Herstellung von Verdünnungsreihen

Tabelle E.1 beschreibt die Herstellung von Verdünnungsreihen für die Prüfung von Wasserproben.

Tabelle E.1 — Herstellung von Verdünnungsreihen

Verdünnungsstufe <i>G</i>	Vorverdünnung der Probe mit Verdünnungswasser	Verdünnung einer Probe durch Hinzufügen der Teststamms in Kulturmedium	Resultierende Verdünnung einer Probe (1→x) mit Verdünnungswasser und Teststamm im Medium	Prozentualer Anteil der Probe im Testansatz
1	1 → 1 keine Vorverdünnung der Probe.	1 → 1,5 80 µl Probe + 40 µl Kultur des Teststamms	1 → 1 (per Definition) Für unverdünnte Wasser oder Abwasserproben ist die Verdünnungsstufe ungeachtet einer möglichen Verdünnung durch die Zugabe des Teststamms als 1→1 definiert	66 %
2	1 → 1,33 z. B. 1,5 ml Probe + 0,5 ml Verdünnungswasser	1 → 1,5	1 → 2	50 %
3	1 → 2 z. B. 1,0 ml Probe + 1,0 ml Verdünnungswasser	1 → 1,5	1 → 3	33,3 %
4	1 → 2,66 z. B. 0,75 ml Probe + 1,25 ml Verdünnungswasser	1 → 1,5	1 → 4	25 %
6	1 → 4 z. B. 0,5 ml Probe + 1,5 ml Verdünnungswasser	1 → 1,5	1 → 6	16,7 %