

DIN EN ISO 19040-2



ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2022-09-29

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser –
Teil 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adeninivorans*)
(ISO 19040-2:2018);
Deutsche und Englische Fassung prEN 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 and English version prEN ISO 19040-2:2022

Qualité de l'eau –

Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduelles –

Partie 2: Test d'oestrogénicité (A-YES, *Arxula adeninivorans*) (ISO 19040-2:2018);

Version allemande et anglaise prEN ISO 19040-2:2022

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 125 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 2: Hefe-Estrogenscreening (A-YES, *Arxula adenivorans*) (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 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 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	siehe	DIN EN ISO 20079

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 adeninivorans*) (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., 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 (ISO 5667-16)*

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 15839, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen (ISO 15839)*

DIN EN ISO 20079, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079)*

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 (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)*

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 oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires – Partie 2: Test d'oestrogénicité (A-YES, *Arxula adeninivorans*) (ISO 19040-2:2018)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Grundlage des Verfahrens	10
5 Störungen	10
6 Geräte und Materialien	11
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	16
8.4 Probenahmeverfahren	16
8.5 Probentransport	16
8.6 Vorbehandlung von Proben	16
8.7 Lagerung von Proben	17
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 Leerwert	18
9.1.5 Probenverdünnung	19
9.1.6 Feldblindwert	19
9.1.7 Plattenbelegung	19
9.1.8 Inokulation der Testplatte	20
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-Leerwerten	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 adeninivorans</i> auf festen Nährböden	33
B.5	Kultivierung der Start- und Hauptkultur	33
B.6	Herstellung lyophilisierter <i>Arxula adeninivorans</i> -Zellen	33
Anhang C	(informativ) Schema des Testprinzips	34
Anhang D	(informativ) Testung von Chemikalien und Extrakten	35
D.1	Allgemeines	35
D.2	Extraktion von Wasserproben	35
D.3	Test mit verdünnten organischen Lösungen und Extrakten	35
Anhang E	(informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen	36
Anhang F	(informativ) Verfahrenskenndaten	37
F.1	Validierungsstudie	37
F.1.1	Proben und teilnehmende Laboratorien	37
F.1.2	Ergebnisse für die niedrigste unwirksame Verdünnung (LID) und für die 17 β -Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ)	38
F.1.3	Richtigkeit der Ergebnisse	44
F.2	Sensitivität gegenüber ausgewählten Verbindungen	47
Anhang G	(informativ) Statistische Bewertung	49
Anhang H	(informativ) Berechnung von Estradiol-Äquivalenten	50
H.1	Allgemein	50
H.2	Modellierung der Dosis-Wirkungsbeziehung	50
H.3	Berechnung von Estradiol-Äquivalenten für getestete Proben	51
H.4	Untersuchungsbericht zu Estradiol-Äquivalenten für getestete Proben	51
Anhang I	(informativ) Alternatives Testdesign für die EEQ-Bestimmung	53
Anhang J	(informativ) Messung der niedrigsten unwirksamen Verdünnung (LID) eines Abwassers — Eine vereinfachte Bewertung für die Prüfung von Abwasser	54
J.1	Allgemeines	54
J.2	Prinzip	54
J.3	Herstellung der Verdünnungen für die LID-Bewertung	54
J.4	Test auf LID	54
J.5	Bewertung der Ergebnisse — LID-Wert, Abwasser	54
J.6	Dokumentation der Ergebnisse	54
Anhang K	(informativ) Beispiel für eine statistische Auswertung	55
K.1	Allgemeines	55
K.2	Berechnungen	55
K.2.1	Hintergrundkorrektur	55
K.2.2	Berechnung des relativen Wachstums	55
K.2.3	Berechnungen zur Bewertung von Proben-Leerwerten	55
K.2.4	Berechnungen zur Bewertung der Proben-Trübung	56
K.2.5	Berechnung der Reporter-geninduktion	56
K.2.6	Berechnung der Induktionsraten	57
Literaturhinweise		61

Bilder

Bild C.1 — Schema des Testprinzips in <i>Arxula adeninivorans</i>	34
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung der E2-Verdünnungsreihe für die Dosis-Wirkungskurve	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 LID-Werte, die mit dem <i>Arxula</i> Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden	38
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerten für interpolierte LID-Werte, die mit dem <i>Arxula</i> Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden	40
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Verfahrenskennwerte für 17 β -Estradiol-Äquivalente, die mit dem <i>Arxula</i> Yeast Estrogen Screen (A-YES) erzielt wurden	42
Tabelle F.6 — Bewertung der Richtigkeit für die Proben 2, 5, 8 und 9	45
Tabelle F.7 — Relative Potenz zu 17 β -Estradiol für ausgewählte Verbindungen	47
Tabelle I.1 — Beispiel für eine Plattenbelegung mit 12 Proben für das alternative Testdesign zur EEQ-Bestimmung	53
Tabelle K.1 — Gemessene und berechnete Werte für Leerwerte	57
Tabelle K.2 — Gemessene und berechnete Werte der Negativkontrolle und Referenzverbindung	58
Tabelle K.3 — Gemessene und berechnete Werte der untersuchten Probe	59

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 prEN ISO 19040-2:2022 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 19040-2:2018 wurde von CEN als prEN ISO 19040-2:2022 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 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) dieser Methode 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 der Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Anhang F zusammengefasst.

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

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 Facheinrichtungen 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*

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:

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

3.3

Verdünnungsstufe

G

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

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

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

3.4

Verdünnungswasser

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

[QUELLE: ISO 20079:2005, 3.7]

3.5

50 % Effektkonzentration

***EC*₅₀**

Konzentration einer Verbindung, die 50 % einer Wirkung verursacht

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

3.6

Feldblindwert

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

[QUELLE: ISO 11074:2015, 4.5.3]

3.7

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 Testprobe 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 Dosis-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

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 Reportergenaktivität verglichen mit der Negativkontrolle

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

3.11

Negativkontrolle

Verdünnungswasser ohne Untersuchungsprobe

[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

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 A-YES (*Arxula* Yeast Estrogen Screen) ist ein Reportergen-Test für die Messung der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha (hER α) durch die in der Probe enthaltenen Substanzen, die einen estrogenen Effekt verursachen. Auf diese Weise detektiert der Test Gesamtheit der estrogenen Aktivität einer Probe in ihrem tatsächlichen Zustand, einschließlich möglicher additiver, synergistischer und antagonistischer Mischungseffekte auf den gesamten Prozess der Reportergenexpression.

Das Gen für den humanen Estrogenrezeptors 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 den Blindwert (3.1) beurteilt. Weitere Informationen in Abschnitt 10.

Wenn gefilterte Proben getestet werden, um Bakterien aus der Probe zu entfernen, werden auch feste Partikel von der Probe abgetrennt. Daher könnten Substanzen mit estrogener 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 Inkubatorschüttler, temperatur- und zeitgesteuert, $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ mit einem Schüttelorbit von mindestens 3 mm.

Sofern der Schüttler keine Inkubatorfunktion besitzt, kann ein Schüttler mit einem Schüttelorbit von mindestens 3 mm in Kombination mit einem Brutschrank (6.17) verwendet werden.

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, nämlich $405\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ und $630\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ oder alternativ $600\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$.

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, $d = 0,1\text{ mg}$.

6.17 Brutschrank 30 °C bis 37 °C mit einer Genauigkeit von $\pm 1\text{ °C}$. 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: 7647-01-0.

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

- 7.1.3 Ethanol**, $\geq 99,8\%$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Molekulargewicht 46,07 g/mol, CAS: 64-17-5.
- 7.1.4 17 β -Estradiol**, $\geq 98\%$, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$, Molekulargewicht 272,38 g/mol, CAS: 50-28-2.
- 7.1.5 Maltose Monohydrate**, $> 95\%$, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 360,32 g/mol, CAS: 6363-53-7.
- 7.1.6 Natriumnitrat**, $> 99\%$, NaNO_3 , Molekulargewicht 84,98 g/mol, CAS: 7631-99-4.
- 7.1.7 Kaliumdihydrogenphosphat**, $\geq 99\%$, KH_2PO_4 , Molekulargewicht 136,09 g/mol, CAS: 7778-77-0.
- 7.1.8 Magnesiumsulfat**, MgSO_4 , Molekulargewicht 120,37 g/mol (wasserfrei), CAS: 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: 10025-77-1.
- 7.1.10 Calciumnitrat**, $> 99\%$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Molekulargewicht 164,09 g/mol, CAS: 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: 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: 67-03-8.
- 7.1.13 Niacin**, $> 99,5\%$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, Molekulargewicht 123,11 g/mol, CAS: 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: 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: 58-85-5.
- 7.1.16 Inositol**, $\geq 99\%$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Molekulargewicht 180,16 g/mol, CAS: 87-89-8.
- 7.1.17 Borsäure**, $> 99,8\%$, H_3BO_3 , Molekulargewicht 61,83 g/mol, CAS: 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: 7758-99-8.
- 7.1.19 Kaliumiodid**, $> 99\%$, KI , Molekulargewicht 166,00 g/mol, CAS: 7681-11-0.
- 7.1.20 Mangansulfat monohydrate**, $> 99\%$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Molekulargewicht 169,02 g/mol, CAS: 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: 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: 10102-40-6.
- 7.1.23 Cobalt(II)-chlorid**, CoCl_2 , Molekulargewicht 129,84 g/mol, CAS: 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: 6132-04-3.
- 7.1.25 Citronensäure**, $> 99,5\%$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Molekulargewicht 192,12 g/mol, CAS: 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: 333338-18-4.
- 7.1.27 Natriumhydroxid**, NaOH , Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS: 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, $\geq 99\%$, NaCl, Molekulargewicht 58,44 g/mol, CAS: 7647-14-5.

7.1.30 Aceton (p.a.), C₃H₆O, 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 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 Testprobe verwenden.

7.3 Teststamm

Der Teststamm leitet sich von *Blastobotrys adenivorans* G1214 Syn.: *Arxula adenivorans* 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-hER α -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-hER α -GAA2(ERE107)-phyK in das *Arxula adenivorans*-Genom wurde durch Transformation der Kassette in die Uracil-auxotrophe Mutante *A. adenivorans* 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 adenivorans*-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 kommerziell erhältlichen Präparaten isoliert werden.

7.4 Medien

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

7.4.1 17 β -Estradiol (E2) Stammlösung.

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

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

7.4.2 17 β -Estradiol (E2) Arbeitslösung.

Die 17 β -Estradiol (E2) Stammlösung (7.4.1) wie folgt 1 → 100 verdünnen: 10 μ l der 17 β -Estradiol (E2) Stammlösung (7.4.1) zu 990 μ l Ethanol (7.1.3) hinzufügen und gut mischen. Für die nachfolgende 1 → 10 Verdünnung 100 μ l der ersten Verdünnung zu 900 μ l 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 17 β -Estradiol (E2) Arbeitslösung bei ≤ -18 °C und nicht länger als 6 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 6 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 6 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 NaCl durch einen geeigneten Mix aus 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 6 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 μ m). Die FeCl₃-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als 6 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 μ m). Die Ca(NO₃)₂-Lösung bei 2 °C bis 8 °C und nicht länger als 6 Monate lagern.

7.4.9 Vitamin-Mix.

Die folgenden Chemikalien einzeln einwiegen:

0,2 g Calcium-D-Panthenat (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 6 Monate lagern.

7.4.10 Hefeminimalmedium mit Maltose.

1 ml FeCl₃-Lösung (7.4.7), 1 ml Ca(NO₃)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 6 Monate lagern.

7.4.11 salzhaltiges Hefeminimalmedium mit Maltose.

1 ml FeCl₃-Lösung (7.4.7), 1 ml Ca(NO₃)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 6 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 6 Monate lagern.

7.4.13 Phytase-Substratlösung.

Eine Phytase-Substratlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml wie folgt herstellen: Mindestens 15 mg 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (7.1.26) einwiegen und in einem äquivalenten Volumen Substratpuffer (7.4.12) 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 6 Monate lagern.

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 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 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 getestet wurde. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Filtration auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in den Referenzen [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 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 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 den Referenzen [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 → 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 → 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 Dosis-Wirkungskurve in braunen Gläschen mit Verschlusskappen und Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Dichtungen herstellen. Tabelle 1 zeigt die Herstellung der E2-Verdünnungen für die Dosis-Wirkungskurve. Reinstwasser (7.2) für die Verdünnungsreihe verwenden. Für die Dosis-Wirkungskurve 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 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 Dosis-Wirkungskurve

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 → 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 gegeben und solange mischen, bis sich das Pellet vollständig gelöst hat (z. B. Verwendung eines Vortexers). Die Hefe in ein verschließbares 2 ml Reaktionsgefäß überführen und etwa 20 s bei 3 000 *g* zentrifugieren. Danach den flüssigen Überstand vorsichtig in ein separates Gefäß überführen.

1 ml des verdünnten Hefeminimalmediums mit Maltose zu dem Pellet pipettieren und dieses resuspendieren (vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird empfohlen). Das Reaktionsgefäß etwa 20 s bei 3 000 *g* zentrifugieren. Den flüssigen Überstand vorsichtig in ein separates Sammelgefäß überführen.

1 ml des verdünnten Hefeminimalmediums mit Maltose zu dem Pellet pipettieren und dieses resuspendieren (vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird empfohlen). Das Reaktionsgefäß etwa 20 s bei 3 000 *g* zentrifugieren. Den flüssigen Überstand vorsichtig in das separate Sammelgefäß überführen.

1 ml des verdünnten Hefeminimalmediums mit Maltose zu dem Pellet pipettieren und dieses resuspendieren (vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird empfohlen). Das geschlossene Reaktionsgefäß mit der Hefe in horizontaler Position auf einem Schüttler befestigen und für etwa 1 h bei 30 °C ± 2 °C schüttelnd inkubieren. Die Schüttelfrequenz ist abhängig vom Orbit des Schüttlers und sollte 50 % der in Tabelle 2 angegebenen Frequenzen betragen.

Tabelle 2 — Schüttelfrequenzen in Abhängigkeit des Orbits des Schüttlers

Orbit mm	Frequenz rpm
3 bis 4,5	750 bis 1 000
15 bis 20	450 bis 480
25	370 bis 390

Schüttler mit gleichem Orbit von verschiedenen Herstellern können unterschiedliche Schüttelcharakteristika besitzen. Eine Bestimmung der optimalen Schüttelfrequenz kann deshalb notwendig sein.

9.1.3 Negativkontrolle

Reinstwasser (7.2) als Negativkontrolle verwenden. Jede 96-Well-Platte muss mindestens zwei Replikate der Negativkontrolle enthalten. Ein Volumen von 400 µl für jedes Replikat verwenden.

9.1.4 Leerwert

Für jede Probe mindestens zwei Leerwert-Replikate (3.1) mit je 400 µl auf derselben 96-Well-Platte mitführen. Die unverdünnte Probe als Leerwert-Replikate einsetzen. Falls es notwendig ist, die Probe für die Leerwert-Replikate zu verdünnen (z. B. bei hoher mikrobieller Belastung der Probe), muss dies in Gleichung (6) berücksichtigt werden (Korrektur der Probenfärbung und/oder nicht enzymvermittelte Substratspaltung). In diesem Fall wird der Nenner in Gleichung (6) durch den Anteil der Probe in den Leerwert-Replikaten ersetzt.

Für die Negativkontrolle und die E2-Referenz sind jeweils zwei Leerwert-Replikate ausreichend. Für den Leerwert der Referenz 17[17]β-Estradiol (7.1.4) wird die Kalibrierstufe (Verdünnungsstufe der Referenz) 80 ng/l eingesetzt.

9.1.5 Probenverdünnung

Die zu testende Probe vor Verwendung durch Schütteln homogenisieren. Aufeinanderfolgende Verdünnungen der Probe mit probenspezifischem Verdünnungswasser herstellen (siehe Anhang E für eine Verdünnungsreihe).

Für Proben mit einer Leitfähigkeit kleiner oder gleich 8,0 mS/cm Reinstwasser (7.2) als Verdünnungswasser verwenden.

Für Proben mit einer Leitfähigkeit größer 8,0 mS/cm muss die Leitfähigkeit des Verdünnungswassers mit NaCl (7.1.30) auf den gleichen Leitfähigkeitswert eingestellt werden. Im Fall von Meer- oder Brackwasserproben darf NaCl durch einen geeigneten Mix aus Salzen mit einer ähnlichen Zusammensetzung wie Meersalz ersetzt werden, z. B. durch Meersalz (7.1.28).

Mindestens vier Replikate für jede Verdünnungsstufe testen.

Eine empfohlene Plattenbelegung für Chemikalien und Extrakte ist in Anhang D gezeigt.

ANMERKUNG Falls die Leitfähigkeit einer Probenserie sich um nicht mehr als 10 % unterscheidet, kann die mittlere Leitfähigkeit dieser Proben für die Einstellung der Leitfähigkeit des Verdünnungswasser herangezogen werden.

9.1.6 Feldblindwert

Den Feldblindwert (3.6) unverdünnt in mindestens vier Replikaten testen. Die Leerwert-Replikate der Negativkontrolle können auch als Leerwerte für den Feldblindwert verwendet werden.

Falls es sinnvoll ist, kann der Feldblindwert auch wie eine Probe analysiert werden. In diesem Fall geeignete Verdünnungen des Feldblindwertes wie in 9.1.5 beschrieben vorbereiten. In Bezug auf die Leerwert-Replikate wie in 9.1.7 beschrieben weiter verfahren.

Für jede Probe muss ein repräsentativer Feldblindwert am selben Tag unter Verwendung der gleichen Medien, Zellkultur und (Geräte-)Ausstattung analysiert werden. Wenn ein Feldblindwert für eine Reihe von Proben repräsentativ ist, darf er nur einmal getestet werden.

9.1.7 Plattenbelegung

Ein Volumen von 400 µl für jedes Well verwenden (Probe, Probenverdünnungen, Verdünnung der Referenz (E2), Negativkontrolle, Feldblindwert, Leerwert-Replikate).

Für jede Probe sollten geeignete Verdünnungen getestet werden (für Abwasserproben sind mindestens sieben Verdünnungen empfohlen). Mindestens vier Replikate jeder Verdünnungsstufe auf derselben 96-Well-Platte untersuchen. Mindestens zwei Leerwert-Replikate jeder Probe auf derselben 96-Well-Platte untersuchen. Die unverdünnte Probe oder die Verdünnung mit der höchsten Probenkonzentration im Test für die Analyse der Leerwerte verwenden.

Zusätzlich muss die Testplatte mindestens zwei Replikate der Negativkontrolle und zwei Replikate für den Leerwert der Negativkontrolle enthalten.

Auf jeder Platte eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Referenz 17[17]β-Estradiol (7.1.4) in Doppelbestimmung testen. Für die Kalibrierstufe (Verdünnungsstufe der Referenz) von 80 ng/l mindestens zwei Leerwert-Replikate testen.

Eine empfohlene Plattenbelegung ist in Anhang A dargestellt.

Die Inokulation der Testplatte mit den reaktivierten Hefezellen muss innerhalb von 2 h nach der Plattenbelegung erfolgen.

Eine Empfehlung für ein alternatives Test-Design (Plattenbelegung) mit nur einer Probenverdünnung ist in Anhang I gezeigt.

9.1.8 Inokulation der Testplatte

9.1.8.1 Herstellung des probenspezifischen Inokulationsmedium

Für jede Probe das Inokulationsmedium herstellen.

Für Proben mit einer Leitfähigkeit kleiner oder gleich 8,0 mS/cm wird salzhaltiges Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.11) als Inokulationsmedium verwendet. Sofern nur wenige Verdünnungen einer Probe analysiert werden sollten und kein Vorwissen zur estrogenen Aktivität der Probe existiert, kann Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) als Inokulationsmedium verwendet werden.

Die Leitfähigkeit des Inokulationsmediums für Proben mit einer Leitfähigkeit größer 8,0 mS/cm durch Mischen verschiedener Volumenanteile des Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.10) und des salzhaltigen Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.11) einstellen: $0,143 \times c(\text{Probe})$ ml des Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.10) und $[5 - 0,143 \times c(\text{Probe})]$ ml des salzhaltigen Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.11) verwenden. Hierbei bezeichnet $c(\text{Probe})$ die Salinität der Probe. Die Salinität auf Basis der Leitfähigkeit einer Verdünnungsreihe von NaCl (7.1.30) in Wasser (7.2) abschätzen, oder die Salinität mit einem geeigneten Gerät messen. Die Volumenanteile der beiden Medien mischen.

Für Proben mit einer Leitfähigkeit größer oder gleich 54,2 mS/cm ausschließlich das Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) als Inokulationsmedium verwenden.

BEISPIEL Eine Probe hat eine Leitfähigkeit von 27,9 mS/cm bei 20 °C. Der Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Salinität wurde durch eine Verdünnungsreihe von NaCl in Reinstwasser bei 20 °C bestimmt. Die berechnete Salinität der Probe ist 18. Das Volumen des Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.10) beträgt $0,143 \times 18 = 2,57$ ml. Das Volumen des salzhaltigen Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.11) beträgt $5 - 0,143 \times 18 = 2,43$ ml.

ANMERKUNG Falls die Leitfähigkeit einer Serie von Proben sich um nicht mehr als 10 % unterscheidet, kann die mittlere Leitfähigkeit der Proben für die Einstellung der Leitfähigkeit des Inokulationsmedium herangezogen werden.

9.1.8.2 Inokulation der Wells ohne Probe

Für die Inokulation der Leerwerte für die Negativkontrolle und die Leerwerte für die Referenzverbindung wie folgt vorgehen: 100 µl des salzhaltigen Hefeminimalmediums mit Maltose (7.4.11) in die entsprechenden Wells pipettieren.

Für die Inokulation der Negativkontrolle und der Referenzverbindung wie folgt vorgehen: 4,8 ml salzhaltiges Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.11) und 0,25 ml der reaktivierten Hefe (9.1.2) in ein Röhrchen (z. B. 15 ml-Röhrchen) überführen. Das Röhrchen vorsichtig schwenken und den Hefe-Minimalmediummix in eine Pipettierwanne gießen. Die Inokulation erfolgt, indem 100 µl des vorbereiteten probenspezifischen Hefe-Minimalmediummixes in die jeweiligen Wells der Deepwell-Platte mit der entsprechenden Probe und den entsprechenden Probenverdünnungen pipettiert werden (eine Mehrkanalpipette oder ein Mikrodispenser wird empfohlen).

Falls für Proben mit einer Leitfähigkeit kleiner oder gleich 8,0 mS/cm Hefeminimalmedium mit Maltose (7.4.10) als Inokulationsmedium verwendet wird, dann muss dasselbe Medium für die Inokulation der Wells ohne Probe verwendet werden. In diesem Fall bitte sicherstellen, dass nur Proben mit einer Leitfähigkeit kleiner oder gleich 8,0 mS/cm parallel auf einer 96-Deepwell-Platte analysiert werden.

9.1.8.3 Inokulation der Wells mit Probe

100 µl des probenspezifischen Inokulationsmediums (9.1.8.1) zu den Leerwerten der Probe pipettieren.

Das verbleibende Volumen (4,8 ml) des probenspezifischen Inokulationsmediums mit 0,25 ml der reaktivierten Hefe (9.1.2) in ein Röhrchen (z. B. 15 ml-Röhrchen) überführen. Das Röhrchen vorsichtig schwenken

und den Hefe-Minimalmediummix in eine Pipettierwanne gießen. Die Inokulation erfolgt, indem 100 µl des vorbereiteten probenspezifischen Hefe-Minimalmediummixes in die Wells der Deepwell-Platte mit der entsprechenden Probe und den entsprechenden Probenverdünnungen pipettiert werden (eine Mehrkanalpipette oder ein Mikrodispenser wird empfohlen).

Nach der vollständigen Inokulation der Testplatte die Deepwell-Platte mit einer luftdurchlässigen Klebefolie versiegeln und kurz zentrifugieren (max. $200 \times g$, 10 s). Die Deepwell-Platte in einen Schüttelinkubator stellen und bei 30 °C bis 32 °C (± 2 °C) für $22 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ inkubieren. Die Schüttelfrequenz hängt vom Orbit des Schüttlers ab und sollte in dem in Tabelle 2 gezeigten Frequenzbereich liegen.

9.2 Messung

9.2.1 Messung der Reportergenaktivität

Den Substratpuffer und Entwickler vor Verwendung auf Raumtemperatur bringen. Mindestens 15 ml der Phytase-Substratlösung (7.4.13) herstellen.

Die Deepwell-Platte in eine geeignete Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiter-Platten stellen. Die Zellen für 10 min bei $700 \times g$ zentrifugieren. Nach der Zentrifugation 50 µl des klaren Überstand von jedem Well in eine neue Mikrotiter-Platte überführen (eine Mehrkanalpipette wird empfohlen). Luftblasen nach Möglichkeit vermeiden und das Hefepellet nicht zerstören. Die Pipettenspitzen müssen nach jedem Pipettiervorgang gewechselt werden.

Anschließend 50 µl der Phytase-Substratlösung (7.4.13) in jedes Well der Mikrotiter-Platte mit dem klaren Überstand pipettieren (eine Mehrkanalpipette oder ein Mikrodispenser wird empfohlen). Die Mikrotiter-Platte mit einem Deckel verschließen und kurz zentrifugieren (max. $200 \times g$, 10 s). Die Mikrotiter-Platte für $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$ bei $37 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ in einen Brutschrank stellen.

Nach $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$ Inkubation die Absorption bei $405 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ in einem Photometer für Mikrotiter-Platten messen. Anschließend 100 µl des Entwicklers (7.4.14) in jedes Well pipettieren (eine Mehrkanalpipette oder ein Mikrodispenser wird empfohlen) und erneut die Absorption bei $405 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ in einem Photometer für Mikrotiter-Platten messen.

Falls die Absorptionsmesswerte außerhalb des linearen Bereiches des Photometers liegen, kann eine weitere Verdünnung das Problem umgehen. Weiterhin ist es möglich, die Inkubationszeit leicht zu verkürzen, z. B. von 1 h auf 45 min.

9.2.2 Messung der Zelldichte

Abhängig vom Wachstum der Hefezellen in der Deepwell-Platte und dem linearen Messbereich des Photometers für Mikrotiter-Platten muss eine geeignete Verdünnung der Hefezellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 300 µl pro Well hergestellt werden. Der quantifizierbare Bereich des Photometers für Mikrotiter-Platten kann mittels einer genauen Verdünnungsreihe einer Hefezellsuspension und einer Auswertung des Zusammenhangs zwischen Verdünnung und Zelldichte bestimmt werden.

Sofern ausreichendes Hefe-Zellwachstum und ein großes Zellpellet nach dem Zentrifugieren der Deepwell-Platte vorliegen: 290 µl Reinstwasser in jedes Well einer 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettieren (Mehrkanalpipette empfohlen). Die Hefezellen in der Deepwell-Platte durch starkes Schütteln resuspendieren (Vortexer empfohlen). Unmittelbar danach 10 µl der Hefezellsuspension aus jedem Well der Deepwell-Platte in die Mikrotiter-Platte überführen (Sedimentation vermeiden, Mehrkanalpipette empfohlen). Die optische Dichte bei $630 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ oder alternativ bei $600 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ messen. Im Fall von geringem Hefezellwachstum mit einem kleinen oder diffusen Pellet eine geringere Verdünnung der Zellsuspension verwenden, z. B. 270 µl Reinstwasser und 30 µl Hefezellsuspension.

Eine zweite Mikrotiter-Platte und eine weitere Verdünnung benutzen, falls die Messwerte für die Zelldichte außerhalb des linearen Bereiches des Photometers für Mikrotiter-Platten liegen.

Die finale optische Dichte für die Negativkontrolle und für die Referenzverbindung durch Multiplikation des Verdünnungsfaktors mit der hintergrundkorrigierten optischen Dichte bei 630 nm berechnen. Für die Hintergrundkorrektur die OD₆₃₀-Werte der Leerwerte der Negativkontrolle verwenden. Anschließend die mittlere optische Dichte aus Negativkontrolle und Referenzverbindung berechnen.

BEISPIEL Eine Verdünnung von 30 µl Hefezellsuspension mit 270 µl Reinstwasser entspricht einem Verdünnungsfaktor von 10. Für einen OD₆₃₀-Wert von 0,641 und einen Verdünnungsfaktor von 10 ergibt sich für die finale OD ein Wert von $0,641 \times 10 = 6,41$.

9.3 Berechnungen

Fast alle Berechnungen basieren auf den Messungen der Reportergenaktivität und der Zelldichte nach Zugabe der Entwickler-Lösung. Lediglich für die Bestimmung von nicht enzymvermittelter Substratspaltung werden die Messungen der Absorption bei 405 nm vor und nach Zugabe des Entwicklers herangezogen.

Eine Beispielrechnung entsprechend Abschnitt 9.3. ist in Anhang K gezeigt.

9.3.1 Hintergrundkorrektur

Die hintergrundkorrigierte Absorption $A_{BC,405}$ für jedes Replikat j des Tests i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC) entsprechend Gleichung (1) berechnen:

$$A_{BC,405}(i,j) = A_{405}(i,j) - \overline{B_{405}}(NC) \quad (1)$$

Dabei ist

$A_{BC,405}(i,j)$ die hintergrundkorrigierte Absorption bei 405 nm für Replikat j des Tests i ;

$A_{405}(i,j)$ die Absorption bei 405 nm für Replikat j des Tests i ;

$\overline{B_{405}}(NC)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 405 nm für die Leerwert-Replikate der Negativkontrolle;

$\overline{B_{405}}(RD)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 405 nm für die Leerwert-Replikate der Referenz.

Die hintergrundkorrigierte Absorption $A_{BC,630}$ für jedes Replikat j des Tests i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC) entsprechend Gleichung (2) berechnen:

$$A_{BC,630}(i,j) = A_{630}(i,j) - \overline{B_{630}}(NC) \quad (2)$$

Dabei ist

$A_{BC,630}(i,j)$ die hintergrundkorrigierte Absorption bei 630 nm für Replikat j des Tests i ;

$A_{630}(i,j)$ die Absorption bei 630 nm für Replikat j des Tests i ;

$\overline{B_{630}}(NC)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 630 nm für die Leerwert-Replikate der Negativkontrolle;

$\overline{B_{630}}(RD)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 630 nm für die Leerwert-Replikate der Referenz.

Sofern es keine signifikanten Unterschiede zwischen $\overline{B_{405}}(NC)$ und $\overline{B_{405}}(RD)$, beziehungsweise zwischen $\overline{B_{630}}(NC)$ und $\overline{B_{630}}(RD)$ gibt, können zusätzlich zu den Leerwert-Replikaten der Negativkontrolle auch die Leerwert-Replikate der Referenz für die Berechnungen herangezogen werden. Die Signifikanz kann durch Varianzanalyse (Signifikanzlevel 1 %) bestimmt werden. Zusätzlich sollten $\overline{B_{405}}(RD)$ und $\overline{B_{630}}(RD)$ nicht mehr als 30 % von $\overline{B_{405}}(NC)$ beziehungsweise $\overline{B_{630}}(NC)$ abweichen.

9.3.2 Berechnung des relativen Wachstums

Das relative Wachstum $G(i,j)$ für jedes Replikat j des Tests i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD) berechnen, um Hefewachstumseffekte zu erfassen. Das relative Wachstum $G(i,j)$ entsprechend Gleichung (3) berechnen:

$$G(i,j) = \frac{A_{BC,630}(i,j)}{\overline{A_{BC,630}}(NC)} \quad (3)$$

Dabei ist

$G(i,j)$ das relative Wachstum für Replikat j des Tests i ;

$A_{BC,630}(i,j)$ die hintergrundkorrigierte Absorption bei 630 nm für Replikat j des Tests i ;

$\overline{A_{BC,630}}(NC)$ der (robuste) Mittelwert der korrigierten Absorption bei 630 nm für die Replikate der Negativkontrolle;

$\overline{A_{BC,630}}(RD)$ der (robuste) Mittelwert der korrigierten Absorption bei 630 nm für die Replikate aller Referenzverdünnungen.

Sofern keine signifikanten Unterschiede zwischen $\overline{A_{BC,630}}(NC)$ und $\overline{A_{BC,630}}(RD)$ bestehen, können zusätzlich zu den Absorptionswerten der Negativkontrolle auch die Absorptionswerte der Referenz einbezogen werden. Die Signifikanz kann durch Varianzanalyse (Signifikanzlevel 1 %) bestimmt werden. Zusätzlich sollte der verdünnungsspezifische Mittelwert der korrigierten Absorption der Referenz $\overline{A_{BC,630}}(RD)$ nicht mehr als 30 % vom Mittelwert der korrigierten Absorption der Negativkontrolle $\overline{A_{BC,630}}(NC)$ abweichen.

Für jeden Test i sollte die relative Standardabweichung der hintergrundkorrigierten Absorption bei 630 nm der Replikate $[A_{BC,630}(i,j)] \leq 15\%$ sein. Andernfalls könnten Probleme während der Testdurchführung aufgetreten sein. Die Ergebnisse der relativen Standardabweichung von $A_{BC,630}(i,j)$ müssen in den Untersuchungsbericht aufgenommen werden.

Weiterhin wird das relative Wachstum $\overline{G}(i)$ für jeden Test i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD) entsprechend Gleichung (4) berechnet:

$$\overline{G}(i) = \text{mean}(G(i,j)) \quad (4)$$

Dabei ist

$G(i,j)$ das relative Wachstum für Replikat j des Tests i ;

$\overline{G}(i)$ das (mittlere) relative Wachstum für den Test i .

Für die Berechnung des Mittelwertes kann ein robustes statistisches Verfahren angewendet werden.

9.3.3 Berechnungen zur Bewertung von Proben-Leerwerten

9.3.3.1 Berechnungen zur Bewertung der Eigenfärbung der Proben und nicht enzymvermittelter Substratspaltung

Eigenfärbung der Proben

Die relative Absorption A_D für Probe S entsprechend Gleichung (5) berechnen:

$$A_D(S) = \frac{\overline{B_{405}}(S)}{\overline{B_{405}}(NC)} \quad (5)$$

Dabei ist

A_D die relative Absorption für Probe S;

$\overline{B_{405}}(S)$ der (robust) Mittelwert der Absorption bei 405 nm für die Leewert-Replikate der Probe S;

$\overline{B_{405}}(NC)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 405 nm für die Leewert-Replikate der Negativkontrolle.

Sofern $A_D(S) > 1,5$ ist, hat die Probe eine vergleichbare Färbung wie das Produkt der Reporterenzymreaktion und/oder es kommt zu einer nicht enzymvermittelten Substratspaltung. In diesem Fall den Korrekturfaktor A_E für jede Probenverdünnung i der Probe S entsprechend Gleichung (6) berechnen:

$$A_E(i) = \frac{[\overline{B_{405}}(S) - \overline{B_{405}}(NC)] \times P(i)}{0,8} \quad (6)$$

Dabei ist

$A_E(i)$ der Korrekturwert für die Probenverdünnung i der Probe S;

$P(i)$ der Probenanteil an der Probenverdünnung i .

Wenn $A_D(S) \leq 1,5$ ist, wird der Korrekturwert $A_E(i)$ auf 0 gesetzt.

BEISPIEL 250 µl Probe, 150 µl Verdünnungswasser und 100 µl Inokulationsmedium ergeben ein Gesamtvolumen von 500 µl. Der zugehörige Volumenanteil der Probe für diese Probenverdünnung ist $P(i) = 250/500 = 0,5$.

Sofern keine signifikanten Unterschiede zwischen $\overline{B_{405}}(NC)$ und $\overline{B_{405}}(RD)$ bestehen, können zusätzlich zu den Absorptionswerten der Negativkontrolle auch die Absorptionswerte der Referenz einbezogen werden. Die Signifikanz kann durch Varianzanalyse (Signifikanzlevel 1 %) bestimmt werden. Zusätzlich sollte $\overline{B_{405}}(RD)$ nicht mehr als 30 % von $\overline{B_{405}}(NC)$ abweichen.

Nicht enzymvermittelte Substratspaltung

Anhand der Messungen der Absorption bei 405 nm für die Leerwerte der Proben, für die Negativkontrolle und für die Referenz vor und nach Zugabe der Entwicklerlösung (9.2.1), kann bestimmt werden, ob die Probenfärbung teilweise durch nicht enzymvermittelte Substratspaltung verursacht worden sein könnte.

Die Differenz D_{SC} für jedes Replikat j des Tests i [Leerwerte der Proben (SB), der Negativkontrolle (NB), der Referenz (RB)] entsprechend Gleichung (7) berechnen:

$$D_{SC}(i,j) = B_{405}(i,j) - B_{405, \text{before}}(i,j) \quad (7)$$

Dabei ist

$D_{SC}(i,j)$ die Differenz D_{SC} für jedes Replikat j des Tests i ;

$B_{405}(i,j)$ die Absorption bei 405 nm für Replikat j des Tests i nach Zugabe des Entwicklers;

$B_{405, \text{before}}(i,j)$ die Absorption bei 405 nm für Replikat j des Tests i vor Zugabe des Entwicklers.

Weiterhin den Mittelwert der Differenz D_{SC} für jedes Replikat j des Tests i [Leerwerte der Proben (SB), der Negativkontrolle (NB), der Referenz (RB)] entsprechend Gleichung (8) berechnen:

$$\overline{D_{SC}}(i) = \text{mean}(D_{SC}(i,j)) \quad (8)$$

Eine nicht enzymvermittelte Substratspaltung findet statt, wenn die mittlere Differenz für die Leerwerte der Proben $\left[\overline{D_{SC}}(SB)\right]$ abzüglich der mittleren Differenz für die Leerwerte der Negativkontrollen $\left[\overline{D_{SC}}(NB)\right]$ mehr als 15 % der mittleren korrigierten Absorption bei 405 nm der Negativkontrolle $\left[\overline{A_C}(NC)\right]$ [siehe Gleichung (13) bzw. Gleichung (14)] beträgt.

Alternativ Parameter a statt der korrigierten Absorption bei 405 nm der Negativkontrolle verwenden [a ist der untere Kurvenpunkt des Vier-Parameter-Modells, der die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Referenzverbindung und der korrigierten Absorption beschreibt (siehe Anhang H für weitere Informationen)].

Sofern kein signifikanter Unterschied zwischen $D_{SC}(NB)$ [Differenzen der Leerwerte für Negativkontrolle (NB)] und $D_{SC}(RB)$ [Differenzen der Leerwerte für die Referenz (RB)] besteht, kann die mittlere Differenz $\overline{D_{SC}}(NB,RB)$ der Leerwerte für Negativkontrollen (NB) und der Leerwerte für die Referenz (RB) eingesetzt werden, anstatt der alleinigen Verwendung der mittleren Differenz der Leerwerte für Negativkontrollen $\left[\overline{D_{SC}}(NB)\right]$. Die Signifikanz kann durch Varianzanalyse (Signifikanzlevel 1 %) bestimmt werden.

Es ist in den Untersuchungsbericht aufzunehmen, falls die Probe eine ähnliche Färbung wie das Produkt des Reporterenzymys aufweist und/oder eine nicht enzymvermittelte Spaltung des Substrats stattfindet. Jedoch sollte zur Kenntnis genommen werden, dass diese Effekte durch die beschriebenen Berechnungsverfahren berücksichtigt und korrigiert werden.

9.3.3.2 Berechnungen zur Bewertung der Probentrübung

Die relative Absorption A_F für Probe S entsprechend Gleichung (9) berechnen:

$$A_F(S) = \frac{\overline{B_{630}}(S)}{\overline{B_{630}}(NC)} \quad (9)$$

Dabei ist

A_F die relative Absorption für Probe S;

$\overline{B_{630}}(S)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 630 nm für die Leerwert-Replikate der Probe S;

$\overline{B_{630}}(NC)$ der (robuste) Mittelwert der Absorption bei 630 nm für die Leerwert-Replikate der Negativkontrolle.

Sofern keine signifikanten Unterschiede zwischen $\overline{B_{630}}(NC)$ und $\overline{B_{630}}(RD)$ bestehen, kann zusätzlich zur Absorption der Negativkontrolle und die der Referenz einbezogen werden. Die Signifikanz kann durch Varianzanalyse (Signifikanzlevel 1 %) bestimmt werden. Zusätzlich sollte $\overline{B_{630}}(RD)$ nicht mehr als 30 % von $\overline{B_{630}}(NC)$ abweichen.

Wenn die relative Absorption A_F für die Probe $S > 3$ ist, könnte die Probe trüb sein. Ein Grund dafür kann eine relativ hohe mikrobielle Belastung der Probe sein. Andererseits können Partikel in der Probe vorhanden sein. In diesem Fall kann eine (sterile) Filtration der jeweiligen Probe sinnvoll sein. Dies muss auf jeden Fall in den Untersuchungsbericht aufgenommen werden.

9.3.4 Berechnung der Reporterogeninduktion

Die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j des Tests i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC) berechnen.

Berechnung der korrigierten Absorption für Probenverdünnungen

Die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Probenverdünnung i und der Probe S entsprechend der folgenden Prozedur berechnen:

Die Signifikanz (Signifikanzlevel 1 %) von Wachstumseffekten über alle Probenverdünnungen i für Probe S unter Anwendung der hintergrundkorrigierten Absorption bei 630 nm $A_{BC,630}(i,j)$ bestimmen. Die Signifikanz von Wachstumseffekten kann durch Varianzanalyse bestimmt werden.

Weiterhin das mittlere relative Wachstum $\bar{G}$ für Probe S entsprechend Gleichung (10) berechnen:

$$\bar{G}(S) = \text{mean}(\bar{G}(i)) \quad (10)$$

Dabei ist

$\bar{G}(S)$ das mittlere relative Wachstum für Probe S;

$\bar{G}(i)$ das mittlere relative Wachstum für die Probenverdünnung i der Probe S.

Für die Berechnung des Mittelwertes kann ein robustes statistisches Verfahren angewendet werden.

Eine Wachstumskorrektur durchführen, wenn:

- 1) es signifikante Wachstumseffekte zwischen Probenverdünnungen von Probe S gibt und wenn das relative Wachstum $\bar{G}(i)$ für die Verdünnungsstufe mit dem niedrigsten Probenanteil $\geq 0,85$ ist;

ODER

- 2) es keine signifikanten Wachstumseffekte zwischen Probenverdünnungen von Probe S gibt, aber das mittlere relative Wachstum $\bar{G}(S)$ statistisch signifikant > 1 ist.

Die Wachstumskorrektur durch Berechnung der korrigierten Absorption A_C für jedes Replikat j der Probenverdünnung i und der Probe S entsprechend Gleichung (11) durchführen:

$$A_C(i,j) = \frac{A_{BC,405}(i,j) - A_E(i) - \overline{A_{BC,405}}(NC)}{\bar{G}(i)} + \overline{A_{BC,405}}(NC) + \overline{B_{405}}(NC) \quad (11)$$

Falls keine Wachstumskorrektur notwendig ist, die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Probenverdünnung i und der Probe S entsprechend Gleichung (12) berechnen:

$$A_C(i,j) = A_{BC,405}(i,j) - A_E(i) + \overline{B_{405}}(NC) \quad (12)$$

Dabei ist

$A_C(i,j)$ die korrigierte Absorption für Replikat j der Probenverdünnung i der Probe S;

$A_{BC,405}(i,j)$ die hintergrundkorrigierte Absorption bei 405 nm für Replikat j der Probenverdünnung i der Probe S;

$\overline{A_{BC,405}}(NC)$ die mittlere hintergrundkorrigierte Absorption bei 405 nm der Negativkontrolle ist. Alternativ den hintergrundkorrigierten Parameter a verwenden, z. B. $a - \overline{B_{405}}(NC)$ [a ist der untere Kurvenpunkt des Vier-Parameter-Modells, das die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Referenzverbindung und der korrigierten Absorption beschreibt (siehe Anhang H für weitere Informationen)];

$\overline{B}_{405}(\text{NC})$ der (robuste) Mittelwert der Leerwert-Replikate der Negativkontrolle bei 405 nm;

$A_E(i)$ der Korrekturwert für die Probenverdünnung i der Probe S;

$\overline{G}(i)$ das relative Wachstum in der Probenverdünnung i der Probe S.

Berechnung der korrigierten Absorption für die Verdünnungen der Referenzverbindung und der Negativkontrolle

Die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Verdünnungen der Referenzverbindung i entsprechend der folgenden Prozedur berechnen:

Die Signifikanz (Signifikanzlevel 1 %) von Wachstumseffekten über alle Referenzverdünnungen i unter Anwendung der hintergrundkorrigierten Absorption bei 630 nm $A_{\text{BC},630}(i,j)$ bestimmen. Die Signifikanz von Wachstumseffekten kann durch Varianzanalyse bestimmt werden.

Falls es signifikante Wachstumseffekte zwischen Referenzverdünnungen gibt und falls das relative Wachstum für die 1 ng/l-Referenzverdünnung $\geq 0,85$ ist, eine Wachstumskorrektur durchführen. Die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Referenzverdünnung i entsprechend Gleichung (13) berechnen:

$$A_C(i,j) = \frac{A_{\text{BC},405}(i,j) - \overline{A_{\text{BC},405}}(\text{NC})}{\overline{G}(i)} + \overline{A_{\text{BC},405}}(\text{NC}) + \overline{B}_{405}(\text{NC}) \quad (13)$$

Falls keine Wachstumskorrektur notwendig ist, die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Referenzverdünnung i entsprechend Gleichung (14) berechnen:

$$A_C(i,j) = A_{\text{BC},405}(i,j) + \overline{B}_{405}(\text{NC}) \quad (14)$$

Dabei ist

$A_C(i,j)$ die korrigierte Absorption für Replikat j der Referenzverdünnung i ;

$A_{\text{BC},405}(i,j)$ die hintergrundkorrigierte Absorption bei 405 nm für Replikat j der Referenzverdünnung i ;

$\overline{A_{\text{BC},405}}(\text{NC})$ die mittlere hintergrundkorrigierte Absorption bei 405 nm der Negativkontrolle;

$\overline{B}_{405}(\text{NC})$ der (robuste) Mittelwert bei 405 nm der Leerwert-Replikate der Negativkontrolle;

$\overline{G}(i)$ das relative Wachstum der Referenzverdünnung i .

Statt $\overline{G}(i)$ können geschätzte Wachstumskorrekturfaktoren verwendet werden, um den Einfluss von ungenauen Wachstumsmessungen zu reduzieren.

Die korrigierte Absorption A_C für jedes Replikat j der Negativkontrolle entsprechend Gleichung (14) berechnen.

Berechnung der mittleren korrigierten Absorption

Anschließend die mittlere korrigierte Absorption $\overline{A_C}(i)$ für jeden Test i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC) unter Verwendung der korrigierten Absorption $A_C(i,j)$ für jedes Replikat j des Tests i berechnen. Für die Berechnung des Mittelwertes kann ein robustes statistisches Verfahren angewendet werden.

Berechnung der Induktionsraten

Die Induktionsrate I für den Test i (Probenverdünnungen SD, Referenzverdünnungen RD, Negativkontrolle NC) entsprechend Gleichung (15) berechnen:

$$I(i) = \frac{\bar{A}_C(i)}{\bar{A}_C(\text{NC})} \quad (15)$$

Dabei ist

$I(i)$ die Induktionsrate für den Test i ;

$\bar{A}_C(i)$ der (robuste) Mittelwert der korrigierten Absorption aller Replikate des Tests i ;

$\bar{A}_C(\text{NC})$ der (robuste) Mittelwert der korrigierten Absorption aller Replikate der Negativkontrolle ist. Alternativ den Parameter a verwenden [a ist der untere Kurvenpunkt des Vier-Parameter-Modells, das die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Referenzverbindung und der Induktionsrate beschreibt (siehe Anhang H für weitere Informationen)].

Für die Modellierung der Dosis-Wirkungskurve die korrigierten Absorptionen aller Replikate der Negativkontrolle und der Verdünnungen der Referenzverbindung [$A_C(i,j)$] verwenden.

Für die Berechnung der Estradiol-Äquivalente die mittlere korrigierte Absorption $\bar{A}_C(i)$ verwenden (weitere Informationen siehe Anhang H. Für die Berechnung der niedrigsten unwirksamen Verdünnung die mittleren korrigierten Absorptionen $\bar{A}_C(i)$ oder die Induktionsraten $I(i)$ verwenden (weitere Informationen siehe Anhang J)).

10 Gültigkeitskriterien

Der gesamte Test ist gültig, wenn:

- a) der EC_{50} der 17β -Estradiol-Dosis-Wirkungsbeziehung ≥ 7 und ≤ 35 ng/l ist (siehe Anhang H für zusätzliche Informationen) (eine geeignete statistische Methode zur Berechnung des EC_{50} verwenden (Referenzen [16], [17], [18]));
- b) die kritische Konzentration, die derjenigen Konzentration entspricht, oberhalb derer eine estrogene Aktivität messbar ist, ≤ 8 ng/l 17β -Estradiol ist; (siehe Anhang G für zusätzliche Informationen) (eine geeignete statistische Methode zur Berechnung der Dosis-Wirkungskurve und zur Berechnung der kritischen Konzentration für die Induktionsrate 1,18 verwenden (Referenzen [16], [17], [18]));
- c) das Verhältnis $d/a \geq 4$ und ≤ 20 ist (siehe Anhang H für zusätzliche Informationen) (eine geeignete statistische Methode zur Berechnung des unteren Kurvenpunktes (a) und des Kurvenplateaus (d) der Dosis-Wirkungskurve verwenden (Referenzen [16], [17], [18]));
- d) das Verhältnis zwischen der mittleren korrigierten Absorption bei 405 nm für die höchste Konzentration des Referenzstandards (80 ng/l 17β -Estradiol) und dem Kurvenplateau (d) der Dosis-Wirkungskurve $\geq 0,75$ ist (eine geeignete statistische Methode zur Berechnung des Kurvenplateaus (d) der Dosis-Wirkungskurve verwenden (Referenzen [16], [17], [18]));
- e) die mittlere relative Standardabweichung (RSD) der korrigierten Absorption bei 405 nm der Replikate der Negativkontrolle und der Referenzverdünnungen ≤ 12 % ist (siehe Anhang H für zusätzliche Informationen) (eine geeignete statistische Methode zur Berechnung der Dosis-Wirkungskurve verwenden (Referenzen [16], [17], [18]));
- f) die mittlere OD für die Zelldichte der Negativkontrolle und der Referenzverdünnungen nach 22 h Inkubation ≥ 1 ist.

Eine Verdünnungsstufe einer Probe ist gültig, wenn:

- g) das relative Wachstum der Hefezellen in dieser Verdünnung $\geq 0,3$ und $\leq 3,5$ ist;
- h) die relative Standardabweichung der korrigierten Absorption bei 405 nm der Replikate ≤ 15 % ist.

Wenn das Kriterium (h) nicht erfüllt ist und mehr als 3 Replikate zur Verfügung stehen, kann ein Ausreißertest (Grubbs-Test) durchgeführt werden. Wird danach das Kriterium (h) wieder nicht erfüllt, alle Replikate von der weiteren statistischen Auswertung ausschließen. Alternativ kann eine statistisch robuste Berechnung dieser Standardabweichung angewendet werden.

Normalerweise kann die Erfüllung der Kriterien (a) und (b) durch präzise Einstellung der Schüttelfrequenz erreicht werden.

11 Bewertungskriterien

Die Testprobe zeigt eine estrogene Aktivität, wenn die Induktionsrate als Maß für die Zunahme der Reporter-genaktivierung den kritischen Wert von 1,18 überschreitet [siehe Anhang G für eine Beschreibung der Bestimmung des kritischen Werts (CL)]. Zusätzlich darf die estrogene Aktivität des Feldblindwertes, die ebenfalls in Form der Induktionsrate gemessen wird, die kritische Grenze von 1,18 nicht überschreiten.

Falls die estrogene Aktivität des Feldblindwertes die Induktionsrate 1,18 überschreitet, wird die kritische Grenze auf die Induktionsrate des Feldblindwertes gesetzt. In diesem Fall zeigt die Testprobe eine estrogene Aktivität, wenn die Induktionsrate der Probe die Induktionsrate des Feldblindwertes übersteigt.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- a) Angabe des verwendeten Untersuchungsverfahrens mit einer Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 19040-2:2018);
- b) Identität der Testprobe (Herkunft und Datum der Probenahme, pH-Wert, Leitfähigkeit);
- c) Referenzverbindung (chemischer Bezeichnung, Quelle, Chargennummer oder vergleichbare Daten, falls verfügbar);
- d) Lagerung der Probe und Vorbereitung der Testprobe (Lagerbedingungen (falls nicht direkt getestet), Einstellung des pH-Wertes, Zentrifugation (einschließlich *g*-Zahl und Dauer), Filtration (einschließlich Filtermaterial und Porengröße) und andere Veränderungen);
- e) Teststamm (Stamm, Datum des Erhalts im Labor, Lagerungsbedingungen);
- f) Testumgebung (Adresse des Labors, Datum des Tests);
- g) Ergebnisse der Gültigkeitskriterien und deren Einhaltung (siehe Abschnitt 10);
- h) Ergebnisse für Plausibilitätskriterien (Trübung und mikrobielle Belastung der Probe (siehe 9.3.3.2), Probenfärbung und/oder nicht enzymvermittelte Substratspaltung (siehe 9.3.3.1), für jede Verdünnungsstufe einer Probe die relative Standardabweichung der hintergrundkorrigierten Absorption bei 630 nm der Replikate $A_{BC,630}(i,j)$ (siehe 9.3.2);
- i) Testergebnisse (Induktionsraten I und korrigierte Absorption A_C für jede getestete Probe, qualitative Bewertung der estrogenen Aktivität jeder getesteten Probe (ja/nein), ggf. EEQ und LID für jede getestete Probe), Angabe toxischer Wirkungen (falls vorhanden), andere Beobachtungen (z. B. Präzipitation, Kontamination). Werden 17β -Estradiol-Äquivalente (EEQ-Werte) für die Probe oder Probenverdünnungen berechnet, wird ein zusätzlicher Bericht gemäß Anhang H empfohlen. Werden LID-Werte berechnet, wird ein zusätzlicher Bericht gemäß Anhang J empfohlen.

13 Verifizierung

Bevor das in diesem Dokument beschriebene Verfahren im ausführenden Labor routinemäßig angewendet wird, muss zunächst das Labors seine Kompetenz bezüglich der Durchführung des Verfahrens nachweisen. Das nachfolgende Verifizierungsprotokoll beschreibt den Ablauf der Prüfung und die Leistungsmerkmale zur Beurteilung der Kompetenz des durchführenden Labors.

Das Verifizierungsprotokoll erfordert, dass das Verfahren mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt wird. Bei diesen Tests sollten sowohl die Referenzverbindung als auch geeignete Testproben analysiert werden. Eine Analyse der Testproben ist nicht erforderlich, wird aber sehr empfohlen.

Die Leistungsbewertung in Bezug auf die Referenzverbindung beruht auf den Kriterien (a) bis (f) entsprechend Abschnitt 10 dieses Dokuments. Sobald die Kriterien (a) bis (f) vom Labor erfüllt sind, ist die Kompetenz zur Durchführung des validierten Verfahrens nachgewiesen.

Die Leistungsbewertung in Bezug auf die Probe basiert auf den Kriterien (g) und (h) entsprechend Abschnitt 10 dieses Dokuments. Wenn das Kriterium (g) erfüllt ist, wird die Leistungsfähigkeit des Verfahrens bezüglich der Probe anhand von Kriterium (h) bewertet.

Für die Beurteilung der Stabilität und Vitalität der lyophilisierten Hefezellen anhand der Kriterien (a) bis (f) entsprechend Abschnitt 10 dieses Dokuments sollte eine laborspezifische Qualitätsregelkarte verwendet werden. Die Qualitätsregelkarte ermöglicht dem Labor, die Kriterien über einen langen Zeitraum zu überwachen und spezifische Entscheidungsgrenzen für die Verwendung der lyophilisierten Hefezellen zu Testzwecken festzulegen.

Für Qualitätsregelkarten kann entweder eine Software für Tabellenkalkulation oder eine validierte Software für höhere Anforderungen in der Qualitätssicherung verwendet werden.

Anhang A (informativ)

Testplattenbelegung

A.1 Allgemeines

In diesem Anhang ist das Schema einer Plattenbelegung für die Analyse von zwei Proben mit acht aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen gezeigt. (siehe Tabelle A.1).

A.2 Testplattenbelegung

Tabelle A.1 — Plattenbelegung für die Analyse von zwei Proben mit acht aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen mit jeweils vier Replikaten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert S1	NC	S1 (Verdünnungsstufe 16)				NC	S2 (Verdünnungsstufe 16)				FB S1
B	Leerwert S1	E2, CL 1	S1 (Verdünnungsstufe 12)				E2, CL 1	S2 (Verdünnungsstufe 12)				
C	Leerwert S2	E2, CL 2	S1 (Verdünnungsstufe 8)				E2, CL 2	S2 (Verdünnungsstufe 8)				
D	Leerwert S2	E2, CL 3	S1 (Verdünnungsstufe 6)				E2, CL 3	S2 (Verdünnungsstufe 6)				
E	Leerwert NC	E2, CL 4	S1 (Verdünnungsstufe 4)				E2, CL 4	S2 (Verdünnungsstufe 4)				FB S2
F	Leerwert NC	E2, CL 5	S1 (Verdünnungsstufe 3)				E2, CL 5	S2 (Verdünnungsstufe 3)				
G	Leerwert R_{CL7}	E2, CL 6	S1 (Verdünnungsstufe 2)				E2, CL 6	S2 (Verdünnungsstufe 2)				
H	Leerwert R_{CL7}	E2, CL 7	S1 (Verdünnungsstufe 1)				E2, CL 7	S2 (Verdünnungsstufe 1)				
NC Negativkontrolle												
S1 Probe 1												
S2 Probe 2												
E2 17 β -Estradiol												
CL Kalibrierlevel (Referenzverdünnung)												
Leerwert S1 Leerwert für Probe 1												
Leerwert S2 Leerwert für Probe 2												
Leerwert R_{KL7} Leerwert für die Referenzverbindung, Kalibrierlevel (Referenzverdünnung) 7												
FB S1 Feldblindwert für Probe 1												
FB S2 Feldblindwert für Probe 2												

Anhang B (informativ)

Gefriertrocknung von *Arxula adenivorans*-Zellen

B.1 Allgemeines

Anhang B beschreibt die Herstellung von lyophilisierten *Arxula adenivorans*-Zellen.

B.2 Reagenzien

B.2.1 Glucose, $\geq 99,5\%$, $C_6H_{12}O_6$, Molekulargewicht 180,16 g/mol, CAS: 50-99-7.

B.2.2 Sorbitol, $\geq 98\%$ für die Biochemie, $C_6H_{14}O_6$, Molekulargewicht 182,18 g/mol, CAS: 50-70-4.

B.2.3 Dikaliumhydrogenphosphat, $> 99\%$, K_2HPO_4 , Molekulargewicht 174,18 g/mol, CAS: 7758-11-4.

B.2.4 Agar, Kobe I.

B.2.5 L-Lysin, $\geq 98,5\%$, Ph. Eur. für die Biochemie, $C_6H_{14}N_2O_2$, Molekulargewicht 146,19 g/mol, CAS: 56-87-1.

B.2.6 Magermilchpulver Blotting Grade, CAS: 68514-61-4.

B.2.7 Saccharose (Sucrose), $\geq 99,5\%$, p.a., $C_{12}H_{22}O_{11}$, Molekulargewicht 342,30 g/mol, CAS: 57-50-1.

B.3 Medien

B.3.1 Glucose-Lösung

20 g Glucose (B.2.1) in 70 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Die Glucose-Lösung auf 100 ml mit Reinstwasser (7.2) auffüllen. Die Lösung autoklavieren.

B.3.2 Sorbitol-Lösung

20 g Sorbitol (B.2.2) in 70 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Die Sorbitol-Lösung auf 100 ml mit Reinstwasser (7.2) auffüllen. Die Lösung autoklavieren.

B.3.3 PBS-Puffer

2,25 g NaCl (7.1.29), 0,435 g K_2HPO_4 (B.2.3) und 0,34 g KH_2PO_4 (7.1.7) einwiegen und in 250 ml Reinstwasser lösen (7.2). Den PBS-Puffer autoklavieren.

B.3.4 Kryo-Medium

45 g Sorbitol (B.2.2) und 100 g Saccharose (B.2.7) in 600 ml Reinstwasser (7.2) lösen. 100 g Magermilchpulver zugeben (B.2.6) und den pH-Wert mit 1 M NaOH (7.1.2) auf 7,5 einstellen. Mit Reinstwasser (7.2) auf 1 000 ml auffüllen. Das Kryo-Medium viermal für 30 min mit einem Dampfsterilisator sterilisieren.

B.3.5 Lysin-Lösung

1 g Lysin (B.2.5) in 100 ml Reinstwasser (7.2) lösen. Die Lysin-Lösung durch einen Sterilfilter (0,2 μ m, Celluloseacetat oder Cellulose-Mischester) in eine sterile Glasflasche mit Schraubkappe filtrieren.

B.3.6 Hefeminimalmedium (HMM) mit Glucose

1 ml der FeCl_3 -Lösung (7.4.7), 1 ml der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (7.4.8), 1 ml der Spurenelement-Lösung (7.4.6) und 0,5 ml Vitaminmix (7.4.9) zu 96,5 ml der Salz-Lösung (7.4.4) pipettieren. Anschließend 100 ml Glucose-Lösung (B.3.1) zum vorbereiteten Mix zugeben. Das Hefeminimalmedium mit Glucose ist fünffach konzentriert.

B.3.7 Hefeminimalmedium (HMM) mit Sorbitol

1 ml der FeCl_3 -Lösung (7.4.7), 1 ml der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (7.4.8), 1 ml der Spurenelement-Lösung (7.4.6) und 0,5 ml Vitaminmix (7.4.9) zu 96,5 ml der Salz-Lösung (7.4.4) pipettieren. Anschließend 100 ml Sorbitol-Lösung (B.3.2) zum vorbereiteten Mix zugeben. Das Hefeminimalmedium mit Sorbitol ist fünffach konzentriert.

B.4 Kultivierung von *Arxula adenivorans* auf festen Nährböden

3 g Agar (B.2.4) in 100 ml Reinstwasser (7.2) lösen und unter Rühren bis zum Siedepunkt erhitzen. Den Agar autoklavieren. Den Agar auf etwa 60 °C abkühlen lassen.

40 ml Hefeminimalmedium mit Glucose (B.3.6) mit 60 ml Reinstwasser (7.2) verdünnen und erwärmen. Das erwärmte Hefeminimalmedium mit Glukose mit dem Agar vereinigen und die Lösung mischen. Etwa 20 ml des Hefeminimal-Agars in sterile Petrischalen gießen und fest werden lassen. *Arxula adenivorans*-Zellen auf Agarplatte verteilen. Die Agarplatte für 72 h bei 30 °C inkubieren.

B.5 Kultivierung der Start- und Hauptkultur

10 ml einfach konzentriertes Hefeminimalmedium mit Glucose (B.3.6) mit 10^7 auf Agarplatten kultivierten Zellen von *Arxula adenivorans* animpfen und die Startkultur bei 30 °C für 48 h auf einem Schüttler inkubieren.

5 ml der Startkultur zu 500 ml einfach konzentriertem Hefeminimalmedium mit Sorbitol (B.3.7) zugeben. Die Hauptkultur in einem Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C für 48 h auf einem Schüttler inkubieren.

B.6 Herstellung lyophilisierter *Arxula adenivorans*-Zellen

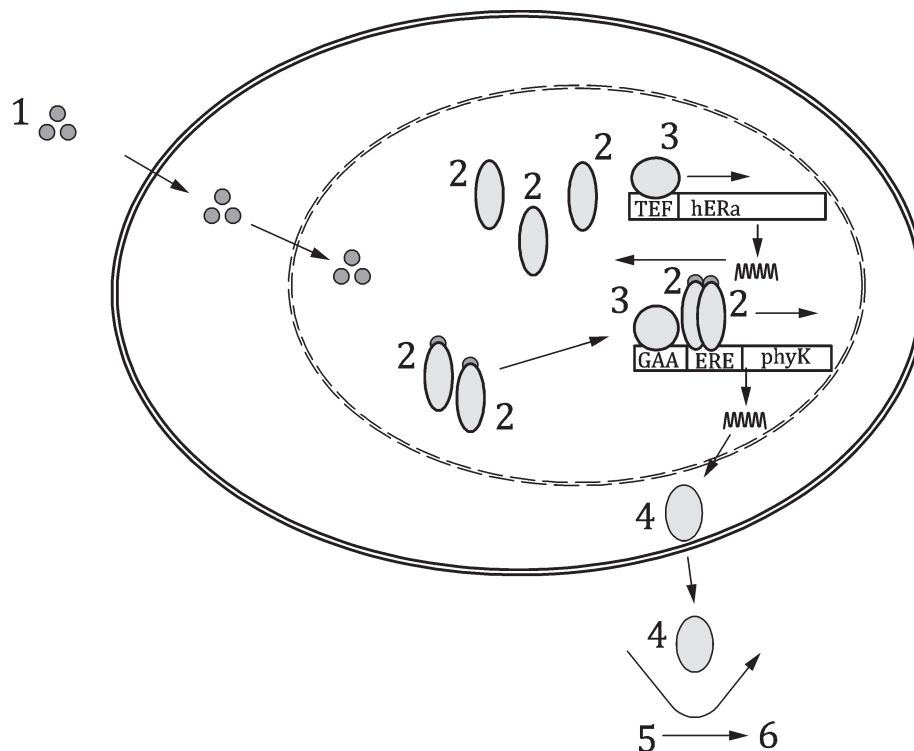
Die Zellsuspension der Hauptkultur in Zentrifugenbehälter überführen (Behältergewicht ermitteln) und die Kultur bei 4 °C und 2 000 g für 10 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen. Das Zellpellet in 30 ml PBS waschen und in ein 50 ml Röhrchen geben. Das Röhrchen bei 4 °C und 2 000 g für 15 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen. Das Gewicht des Zellpellets bestimmen.

10 ml Lysinlösung (B.3.5) zu 100 ml Kryo-Medium zugeben und das Pellet in dieser Mischung resuspendieren (5 ml für 1 g Bio-Feuchtmasse verwenden). Die Mischung 10 min bei 4 °C abkühlen. 200 µl-Aliquote der gekühlten Zellen in Lyophilisierungsfläschchen füllen und diese bei –80 °C einfrieren. Den Lyophilisator vorkühlen und die Fläschchen mit den gefrorenen Zellen auf die Stellfläche stellen. Das Programm mit den folgenden Lyophilisierungsparametern starten: Eiskondensator: –80 °C; Haupttrocknung: Druck: 0,05 mbar; Temperatur der Stellfläche 10 °C; Sicherheitsdruck 0,1 mbar; 6 h bis 12 h Trocknungsprozess.

Anhang C (informativ)

Schema des Testprinzips

Anhang C zeigt das Testprinzip des *Arxula adeninivorans* Yeast Estrogen Screen (siehe Bild C.1).



Legende

- 1 Endokriner Disruptor
- 2 humaner Estrogenrezeptor alpha
- 3 Polymerase
- 4 Phytase
- 5 4-Nitrophenylphosphat
- 6 4-Nitrophenol + Phosphat

Bild C.1 — Schema des Testprinzips in *Arxula adeninivorans*

Das (Xeno)-Estrogen (estrogener Disruptor) diffundiert in die *Arxula adeninivorans* Zelle. Der humane Estrogenrezeptor (hERα) wird heterolog exprimiert [das entsprechende Gen steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (TEF)]. Das Estrogenrezeptorgen-Konstrukt ist in das Genom von *Arxula adeninivorans* integriert. Der estrogene Disruptor bindet an den Estrogenrezeptor und führt zu einer Dimerisierung von hERα. Durch Rezeptorbindung und Dimerisierung wird ein Kernlokalisierungssignal exponiert und das Dimer in den Zellkern transportiert. Das Rezeptordimer bindet und aktiviert einen Promotor, der ein estrogen responsives Element (ERE) enthält. Das Reportergenkonstrukt ist in das Genom von *Arxula adeninivorans* integriert. Die Expression des Reportergens ist proportional zur Aktivierung des hERα durch den estrogene Disruptor. Der Reporter Phytase wird in die extrazelluläre Matrix abgegeben und spaltet 4-Nitrophenylphosphat in 4-Nitrophenol und Phosphat. 4-Nitrophenol kann photometrisch gemessen werden.