

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsaufbau

Das Grundprinzip der Versuche bestand darin, dass Progesteron in Flusswasser oder in sterilisiertes Flusswasser gegeben wurde und der Verlauf der Progesteronkonzentration über einen Versuchszeitraum von 28 Tagen verfolgt wurde. Das Flusswasser wurde der Spree in Berlin entnommen. Die Proben lagerten bei 5 °C oder 20 °C in geschlossenen Gefäßen bei Dunkelheit. In regelmäßigen Abständen wurden bakteriologische Untersuchungen durchgeführt. Um den Abbau von Progesteron im Oberflächenwasser zu untersuchen, wurden drei verschiedene Versuche konzipiert:

Versuch 1: Abbau von Progesteron im Flusswasser (Lagerung bei 5 °C und 20 °C)

Versuch 2: Abbau von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Zusatz von Belebtschlamm (Lagerung bei 5 °C und 20 °C)

Versuch 3: Abbau von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Inokulation einzelner Bakterienspezies (Lagerung bei 20 °C)

Jeder Versuch war in verschiedene Varianten untergliedert (Tab. 1). Jede einzelne Variante wurde für die Untersuchungen dreimal neu angesetzt (Ansatz 1-3), um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 28 Tagen wurden an den Tagen 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 28 aus den einzelnen Ansätzen Proben entnommen und bis zur Bestimmung der Progesteronkonzentrationen bei -20 °C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung des Progesterons wurde zwei- bis sechsmal für jede Probe mittels EIA (Enzymimmunoassay) durchgeführt. Beispielsweise setzte sich im Versuch 2, Variante 1 die Zahl N = 14 aus 4 Messungen im 1. Ansatz, aus 6 Messungen im 2. Ansatz und aus 4 Messungen im 3. Ansatz zusammen (siehe Kapitel 4, Tab. 8 und Kapitel 9, Tab. 5).

Tabelle 1: Übersichtsschema über den Aufbau der Versuche 1 bis 3

Versuch 1 (3 Ansätze)			
<u>Variante 1:</u> Flusswasser mit P4 Lagerung bei 5 °C und 20 °C	<u>Variante 2:</u> steril. Flusswasser mit P4 Lagerung bei 5 °C und 20 °C	<u>Variante 3:</u> Aqua bidest. mit P4 Lagerung bei 20 °C	<u>Variante 4:</u> Flusswasser ohne P4 Lagerung bei 20 °C

Versuch 2 (3 Ansätze)		
<u>Variante 1:</u> steril. Flusswasser mit Belebtschlamm und P4 Lagerung bei 5°C und 20 °C	<u>Variante 2:</u> Aqua bidest. mit Belebtschlamm und P4 Lagerung bei 5 °C	<u>Variante 3:</u> Aqua bidest. mit Belebtschlamm ohne P4 Lagerung bei 20 °C

Versuch 3 (3 Ansätze)	
<u>Variante 1:</u> a) steril. Flusswasser mit <i>A. sobria</i> -Suspension und P4 b) NaCl-Lösung mit <i>A. sobria</i> -Suspension und P4 Lagerung bei 20 °C	<u>Variante 2:</u> a) steril. Flusswasser mit <i>E. coli</i> -Suspension und P4 b) NaCl-Lösung mit <i>E. coli</i> -Suspension und P4 Lagerung bei 20 °C

A. sobria = *Aeromonas sobria*

E. coli = *Escherichia coli*

NaCl-Lösung = physiologische Kochsalzlösung

P4 = Progesteron

steril. = sterilisiert

Bei dem Progesteron, das dem Wasser zugegeben wurde, handelte es sich um 4-Pregnen-3,20-dion (P4). In den einzelnen Versuchsansätzen wurde eine Konzentration von 150 µg P4 pro

10 µl Wasser angestrebt (15 µg/l). Dazu wurde ca. 1 g des lyophilisierten Progesteron-Standards P4 der Firma SIGMA (Bestell Nr. P9776) über Nacht in einen Exsikkator topf gegeben und bei 37 °C im Brutschrank entwässert. Danach wurde 1 mg des getrockneten P4-

Lyophilisates in 1 ml Methanol gelöst. Aus dieser Lösung wurden dann 100 µl entnommen und mit 900 µl Assay Puffer (AP) versetzt (100 µg P4 pro 1 ml AP). Die Zusammensetzung des AP ist auf Seite 38 beschrieben. Anschließend wurden daraus 50 µl entnommen, mit 9,95 ml AP verdünnt (5 µg P4 pro 10 ml AP) und nach Sterilfiltration durch einen Filter mit 1,2 µm Porengröße als P4-Gebrauchslösung verwendet. Es wurden im Versuch 1 jeweils 3 ml P4-Gebrauchslösung zu 97 ml des entsprechenden Wassers hinzugegeben. Bei den Ansätzen mit Belebtschlamm (Versuch 2) bzw. einer Bakterienspezies (Versuch 3) wurden 96 ml Wasser erst mit 1 ml Belebtschlamm bzw. Bakteriensuspension versetzt und dann 3 ml P4-Gebrauchslösung darin gelöst. Das Sterilisieren der Flüssigkeiten sowie der benötigten Gefäße erfolgte bei 121 °C über 20 Minuten im Autoklaven.

3.1.1 Versuch 1 (V1)

Der Versuch 1 diente zur Untersuchung der Hypothese, dass in Oberflächenwasser gelangtes Progesteron von den dort lebenden Mikroorganismen in einem temperaturabhängigen Prozess abgebaut wird. Es wurde ein schnellerer Abbau bei höherer Temperatur gegenüber niedriger Temperatur erwartet. Dazu wurden vier Versuchsvarianten konzipiert (Tab. 2). Um die Wiederholbarkeit der Messergebnisse zu testen, wurden alle Varianten dreimal durchgeführt (Ansatz 1 bis 3).

Tabelle 2: Charakterisierung der Varianten des Versuches 1

Variante	Charakteristika	Lagerungstemperatur	
		5 °C	20 °C
Variante 1	Flusswasser mit P4-Zusatz	x	x
Variante 2	Sterilisiertes Flusswasser mit P4-Zusatz	x	x
Variante 3	Aqua bidest. mit P4-Zusatz	–	x
Variante 4	Flusswasser ohne P4-Zusatz	–	x

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

Variante 1 (Var. 1): Um einen mikrobiellen Abbau des P4 im Flusswasser unter dem Einfluss unterschiedlicher Temperaturen zu untersuchen, wurde Flusswasser mit P4 versetzt und gut durchgemischt. Für die Bestimmung des Ausgangswertes (AW) wurden 2 ml aus der Ausgangslösung entnommen. Die AW-Probe wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurde die Ausgangslösung auf zwei Behältnisse verteilt und bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. An den Tagen 1, 2, 4, 8, 16 und 28 wurden je 2 ml aus dem $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ - und dem 20°C -Ansatz entnommen und als Probe ebenfalls bis zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen eingefroren (Abb. 1a). Die bakteriologische Untersuchung zur Bestimmung der Koloniezahl erfolgte an den Tagen 0, 8 und 28.

Variante 2 (Var. 2): Um einen mikrobiellen Abbau des gelösten P4 auszuschließen, wurde Flusswasser sterilisiert und mit P4 versetzt. Der Ansatz wurde nach Entnahme der AW-Probe unter sterilen Bedingungen auf zwei Gefäße aufgeteilt. Um eine Kontamination der sterilen Lösung mit unerwünschten Keimen zu verhindern, wurden die Ansätze in sterile Probenfläschchen mit Durchstechdeckel gefüllt. Zur Prüfung des Temperatureinflusses wurden die Gefäße bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die weitere Probenentnahme erfolgte an den Tagen 1, 2, 4, 8, 16 und 28 mit steriler Spritze und Kanüle (Abb. 1b). Das Arbeiten mit den sterilisierten Ansätzen erfolgte in einer Sicherheitswerkbank.

Die bakteriologische Untersuchung diente der Kontrolle der Sterilität und wurde an den Tagen 0, 8 und 28 durchgeführt.

Variante 3 (Var. 3): Um einen möglichen Einfluss abiotischer Faktoren in sterilisiertem Flusswasser auf P4 bewerten zu können, wurde als Kontrolle sterilisiertes Aqua bidest. mit P4 versetzt und bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Probenentnahme erfolgte ebenfalls unter sterilen Kauteilen an den Tagen 0, 8 und 16 (Abb. 1c). Da keine großen Konzentrationsänderungen erwartet wurden, sind nur an drei Tagen Proben entnommen worden. Bakteriologische Untersuchungen an den Tagen 0, 8 und 16 dienten der Kontrolle der Sterilität. Die Lagerungstemperatur von $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde mit der Annahme gewählt, dass Veränderungen der Progesteronkonzentration unter abiotischen Verhältnissen bei höherer Temperatur evtl. deutlicher erkennbar werden als bei niedriger.

Variante 4 (Var. 4): Zur Prüfung, ob in unmittelbar vor Versuchsansatz entnommenem Flusswasser messbare Progesteronmengen vorhanden waren, wurden 100 ml Flusswasser ohne Zusatz von P4 bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. An den Tagen 0, 8 und 16 wurden die Proben daraus

entnommen (Abb. 1d). Bei dieser Variante wurde keine bakteriologische Untersuchung durchgeführt.

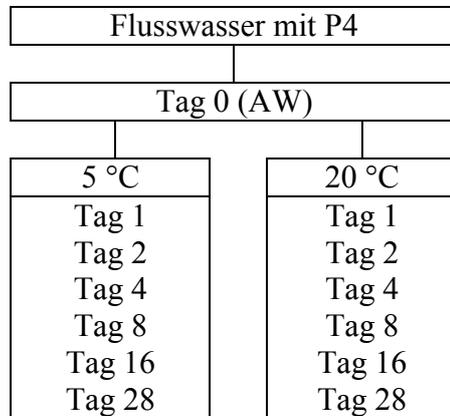


Abb. 1a: Variante 1

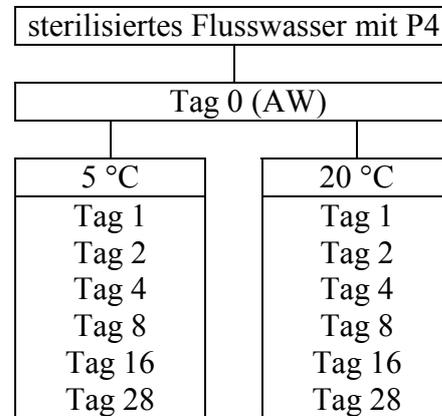


Abb. 1b: Variante 2

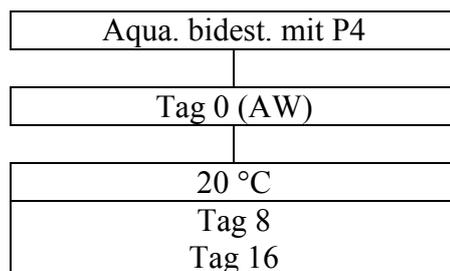


Abb. 1c: Variante 3

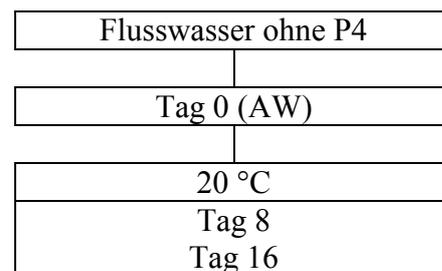


Abb. 1d: Variante 4

Abbildung 1a bis d: Schema der Probenentnahmen im Versuch 1, Varianten 1, 2, 3, 4

P4 = Progesteron

AW = Ausgangswert

3.1.2 Versuch 2 (V2)

Mikroorganismen im Belebtschlamm sind auf den Abbau von organischen Substanzen spezialisiert und werden deshalb im Klärwerk für die biologische Reinigung des Abwassers verwendet. Es wurde vermutet, dass Belebtschlammorganismen einen beschleunigten Abbau von Progesteron im Vergleich zur Mikroflora im Flusswasser herbeiführen und dass dieser Vorgang bei höherer Temperatur schneller abläuft als bei niedriger. Es wurden drei Varianten angesetzt, die sich an die Varianten 1, 3 und 4 des Versuches 1 anlehnten (Tab. 3). Der Be-

lechtschlamm wurde so weit verdünnt, bis die Keimzahl ungefähr der Keimzahl im Flusswasser entsprach (im Bereich $10^3/\text{ml}$).

Der Belebtschlamm wurde für alle Ansätze wiederholt aus Belebungsbecken des Klärwerkes Ruhleben (Berliner Wasserbetriebe) bezogen.

Tabelle 3: Charakterisierung der Varianten des Versuches 2

Variante	Charakteristika	Lagerungstemperatur	
		5 °C	20 °C
Variante 1	Sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und P4-Zusatz	x	x
Variante 2	Aqua bidest. mit Belebtschlamm und P4-Zusatz	x	–
Variante 3	Aqua bidest. mit Belebtschlamm ohne P4-Zusatz	–	x

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

Variante 1 (Var. 1): Zur Prüfung, ob es zu einem schnelleren Abbau von P4 bei Zusatz von Belebtschlamm im Vergleich zu einem P4-Abbau im Flusswasser kommt, wurde sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und P4 versetzt. Nach Entnahme der Proben für den AW wurde der Ansatz auf zwei Gefäße verteilt und bei 5 °C bzw. bei 20 °C gelagert. An den Tagen 1, 2, 4, 8, 16 und 28 erfolgten die weiteren Probenentnahmen mit anschließender Lagerung bei –20 °C (Abb. 2a). An den Tagen 0, 8 und 28 wurde die bakteriologische Untersuchung durchgeführt.

Variante 2 (Var. 2): Um die Progesteron-Abbaufähigkeit der Belebtschlammorganismen in Wasser zu untersuchen, in dem sich gegenüber sterilisiertem Flusswasser keine weiteren Substanzen befinden, wurden Belebtschlamm und P4 zu Aqua bidest. hinzugegeben und bei 5 °C aufbewahrt. Es wurde weiterhin wie bei Variante 1 verfahren (Abb. 2b). Die Lagerungstemperatur von 5 °C wurde mit der Annahme gewählt, dass der Abbau von Progesteron dabei langsamer verläuft als bei 20 °C und um einen Vergleich mit dem 5 °C-Ansatz aus Variante 1 zu ermöglichen. Die bakteriologische Untersuchung wurde an den Tagen 0, 8 und 28 durchgeführt.

Variante 3 (Var. 3): Zur Prüfung, ob im Belebtschlamm messbare Progesteronmengen vorhanden waren, wurde 1 ml Belebtschlamm in 99 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lagerung erfolgte wie bei der Variante 4 des 1. Versuches bei 20 °C. Die Entnahme der Proben erfolgte an den Tagen 8 und 16, nachdem eine Probe für den Ausgangswert am Tag des Ansetzens entnommen worden war (Abb. 2c). Bei dieser Variante wurde keine bakteriologische Untersuchung durchgeführt.



Abb. 2a: Variante 1

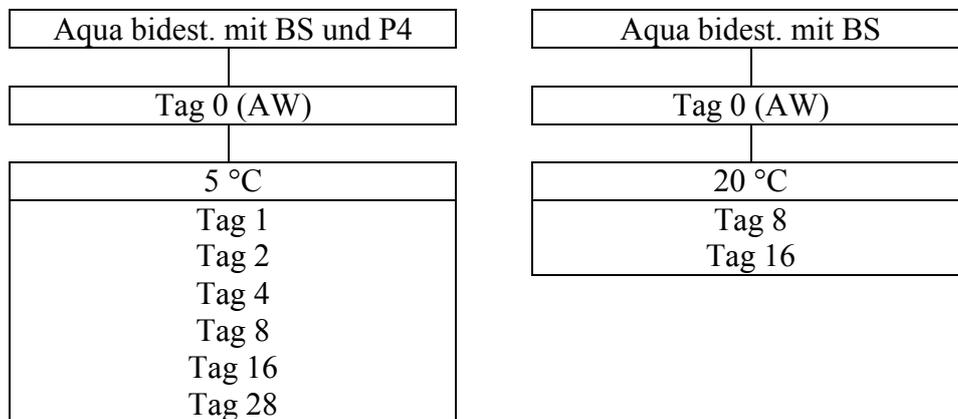


Abb. 2b: Variante 2

Abb. 2c: Variante 3

Abbildung 2a bis c: Schema der Probenentnahmen im Versuch 2, Var. 1, 2, 3

AW = Ausgangswert

BS = Belebtschlamm

P4 = Progesteron

3.1.3 Versuch 3 (V3)

Für die Untersuchung, ob aus dem Flusswasser isolierte Keimspezies die Fähigkeit besitzen P4 abzubauen, wurden diese in sterilisiertem Flusswasser und in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) gelöst.

Aus dem Flusswasser der Spree wurden zunächst verschiedene Keime angezüchtet und isoliert. Dazu wurden Standard I Nähragar-Platten (Standard-I-Agar) und Nähragar I-Platten mit einem Zusatz von 5 % Hammelblut (Blut-Agar) mit 0,1 ml Flusswasser bzw. den Verdünnungsstufen 10^1 , 10^2 , 10^3 und 10^4 beschickt. Die Nähragar-Platten wurden 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert, bevor die Gesamtkeimzahl bestimmt wurde. Dann wurden einzelne deutlich erkennbare Kolonien separat auf Agarplatten über 24 Stunden angezüchtet. Um eine erste Differenzierung durchzuführen, wurden die Keime auf ihre Oxidase-Reaktivität und auf ihr Verhalten bei der Gram-Färbung untersucht. Das war Voraussetzung für die weitere Differenzierung der Keime mit Hilfe des API-Tests (API = Analytischer Profil Index), der von der Firma bioMérieux (20 050) bezogen wurde. Es kamen das API 20 NE System (gramnegative, Oxidase-positive Stäbchen) und das API 20 E System (gramnegative, Oxidase-negative Stäbchen) zur Verwendung. Die Systeme waren mit 20 Mikroröhrchen ausgestattet, in die die zu untersuchende Bakteriensuspension pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 30 °C (API 20 NE) bzw. 37 °C (API 20 E) konnte anhand von Farbreaktionen der Substrate in den Mikroröhrchen die Identifizierung der Keime vorgenommen werden.

Es konnten *Aeromonas sobria* (*A. sobria*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert werden. *A. sobria* ist ein Bakterium, das häufig in durch Abwasser verunreinigtem Flusswasser vorkommt. *E. coli* ist ein Fäkalkeim, der ebenfalls häufig im Flusswasser vorhanden ist.

Aus jedem dieser Keime erfolgte die Herstellung einer Keimsuspension in einer Verdünnung von 10^8 . Dazu wurde das identifizierte Bakterium auf Blut-Agar angezüchtet. Anschließend wurde die Nähragar-Platte mit ca. 3 ml NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Suspension wurde dann mit einer Einmalpipette abgesogen, in ein steriles Röhrchen gegeben und eine Verdünnung von 1:10 hergestellt. Davon wurden 700 µl in eine Küvette gegeben und mit dem Photometer SPECORD 200 (Carl Zeiss Technology, Analytic Jena) gegen den Leerwert gemessen. Ein OD-Messwert von 1,0 entspricht einer Konzentration der Keimsuspension von 10^8 /ml. Um diesen Messwert zu erhalten, waren je nach Keimsuspension mehrere Verdünnungsschritte notwendig.

Es wurde dann 1 ml der jeweiligen Keimsuspension zusammen mit 3 ml P4-Gebrauchslösung in 96 ml sterilisiertes Flusswasser oder NaCl-Lösung (0,9 %) gegeben. Der Konzentrationsverlauf des P4 wurde dann über 28 Tage gemessen. Da die beiden verschiedenen Keime jeweils in sterilisiertem Flusswasser und NaCl-Lösung gelöst wurden, ergaben sich die Varianten 1a und b sowie 2 a und b (Tab. 4). Die Ansätze wurden bei 20 °C gelagert, weil erwartet wurde, dass die Mikroorganismen dabei eine höhere Stoffwechselleistung haben als bei 5 °C. Die Koloniezahl der jeweiligen Keimsuspension wurde an den Tagen 0, 8 und 28 überprüft.

Tabelle 4: Charakterisierung der Varianten des Versuches 3

Variante	Charakteristika	Lagerungstemperatur	
		5 °C	20 °C
Variante 1a	Sterilisiertes Flusswasser mit <i>Aeromonas sobria</i> und P4-Zusatz	–	x
Variante 1b	Sterilisiertes NaCl mit <i>Aeromonas sobria</i> und P4-Zusatz	–	x
Variante 2a	Sterilisiertes Flusswasser mit <i>Escherichia coli</i> und P4-Zusatz	–	x
Variante 2b	Sterilisiertes NaCl mit <i>Escherichia coli</i> und P4-Zusatz	–	x

NaCl = NaCl-Lösung

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

Variante 1a (Var. 1a): Um zu prüfen, ob *A. sobria* eigenständig in der Lage ist P4 abzubauen, wurde sterilisiertes Flusswasser mit der Keimsuspension (10^8) versetzt und P4 hinzugegeben (Abb. 3a).

Variante 1b (Var. 1b): Sterilisierte NaCl-Lösung wurde mit der *A. sobria*-Keimsuspension (10^8) versetzt und P4 hinzugegeben, um die potenzielle Abbauleistung in einem Milieu ohne abiotische Verunreinigung zu prüfen (Abb. 3b).

Variante 2a (Var. 2a): Sterilisiertes Flusswasser wurde mit *E. coli*-Keimsuspension (10^8) sowie P4 versetzt (Abb. 3a), um einen möglichen Abbau von P4 durch *E. coli* zu untersuchen.

Variante 2b (Var. 2b): Sterilisierte NaCl-Lösung wurde mit der Suspension (10^8) des Keimes *E. coli* versetzt und P4 hinzugegeben (Abb. 3b), um das Abbauvermögen von *E. coli* in abiotischem Milieu zu testen.

Die Probenentnahme erfolgte bei allen Varianten an den Tagen 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 28 (Abb. 3a und b). Wie in den anderen beiden Versuchen wurden an den Tagen 0, 8 und 28 bakteriologische Untersuchungen durchgeführt.

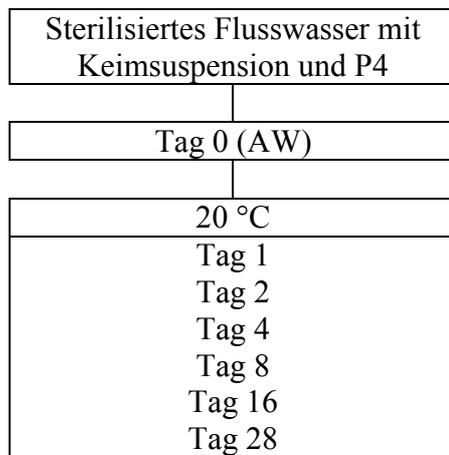


Abb. 3a: Variante 1a und 2a

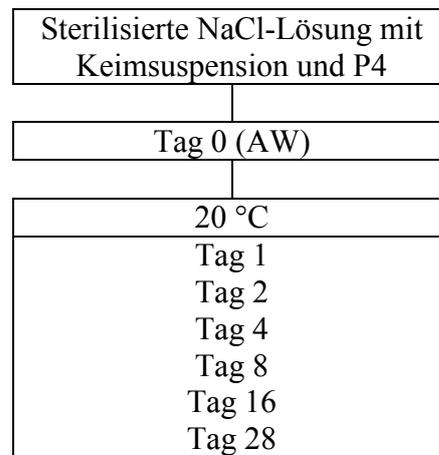


Abb. 3b: Variante 1b und 2b

Abbildung 3a und b: Schema der Probenentnahmen im Versuch 3, Variante 1a, 1b, 2a, 2b

AW = Ausgangswert

P4 = Progesteron

3.2 Enzymimmunologische Progesteronbestimmung

Das zur Bestimmung der Progesteronkonzentrationen verwendete enzymimmunologische Messverfahren wird als kompetitiver ELISA (enzyme-linked immunosorbend assay) bezeichnet, bei dem das gesuchte Antigen (hier Progesteron) mit einem markierten Antigen um die Bindungsstelle am Antikörper konkurriert. Diese Immunreaktion wird im weiteren Verlauf durch eine enzymkatalysierte Reaktion sichtbar und quantitativ auswertbar gemacht.

Die 96 Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden zu Beginn mit unspezifischen Antikörpern (Schaf-Anti-Kaninchen IgG) beschichtet. Im Laufe der Testdurchführung werden beim Kaninchen erzeugte hormonspezifische Antikörper (AK 2) hinzu pipettiert, die an die unspezifischen Antikörper binden (Doppelantikörpertechnik). Die spezifischen Antikörper haben eine Bindungsstelle für das Hormon, um die die oben genannten markierten und nicht markierten Komponenten konkurrieren. Als markiertes Antigen wird biotinyliertes Progesteron eingesetzt. An das Biotin bindet später Streptavidin, an welches Peroxidase gebunden ist. Die Peroxidase (POD) katalysiert die Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Wasserstoffperoxid, wobei Tetramethylbenzidin (TMB) als Farbverstärker Anwendung findet. Dabei entsteht ein fluoreszierender Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann. Das Ergebnis der Extinktionsmessung ist umgekehrt proportional zur Menge des zu untersuchenden Progesterons bzw. proportional zu der Menge des gebundenen biotinylierten Progesterons.

Das Testkit für diesen ELISA wurde vom Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien bezogen und beinhaltet folgende Komponenten:

- Coating-Antikörper: unspezifischer Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper, der beim Schaf gegen das IgG des Kaninchens erzeugt wurde
- Antikörper (AK): spezifischer Antikörper gegen Progesteron, der beim Kaninchen erzeugt wurde
- Enzymlabel (EL): biotinyliertes Progesteron (markiertes Antigen)
- Progesteronlyophilisat als Standardsubstanz

Im Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurden folgende Kreuzreaktionen des Antikörpers gegen Progesteron ermittelt (Tab. 5):

Tabelle 5: Kreuzreaktionen des Progesteron-Antikörpers

Steroid	Kreuzreaktionen in %
4-Pregnen-3,20-dion (P4)	100
4-Pregnen-6 β -3,20-dion	0,1
4-Pregnen-2 α -ol-3,20-dion	182
4-Pregnen-20 α -ol-3-one	<0,1
4-Pregnen-20 β -ol-3-one	0
4-Pregnen-3 β -ol-20-one	14
4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion	0
5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol	0
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-one	89
5 α -Pregnan-3 β -ol-20-one	56
5 α -Pregnan-3,20-dion	168
5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0
5 β -Pregnan-3 α ,20 β -diol	0
5 β -Pregnan-3,20-dion	26
5 β -Pregnan-3 α -ol-20-one	88
5 β -Pregnan-3 β -ol-20-one	5
5-Pregnen-3 β -ol-20-one	17
1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one	0

Es bestehen Kreuzreaktionen des Progesteron-Antikörpers insbesondere zu 4-Pregnen-2 α -ol-3,20-dion (182 %), zu 5 α -Pregnan-3,20-dion (168 %) sowie zu 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-one (89 %) und 5 β -Pregnan-3 α -ol-20-one (88 %), aber auch zu anderen Progesteronmetaboliten.

3.2.1 Vorbereitungen zur Testdurchführung

Die Durchführung des Tests erforderte die Herstellung folgender Puffer und Lösungen:

Coating-Puffer

1,59 g Na₂CO₃ (Merck 6392)

2,93 g NaHCO₃ (Merck 6329)

mit 1 M HCl auf pH 9,6 einstellen (ca. 10 ml)

Aqua bidest. ad 1000 ml

Haltbarkeit im Kühlschrank: 14 Tage

Gegencoatingpuffer

3,146 g Trishydroxymethylaminomethan (Merck 8382) 20 mM

23,3 g NaCl (Merck 6404)

13 g Albumin (BSA, Sigma A-4503)

1,3 g NaN₃ (Merck 6688)

Einstellung des pH 7,5 mit 1 M HCl (ca. 40 ml)

Aqua bidest. ad 1300 ml

Haltbarkeit im Kühlschrank: 4 Wochen

Sterilfiltration durch Spritzenfilter (Porengröße 1,2 µm)

Assay-Puffer (AP)

2,24 g Trishydroxymethylaminomethan (C₄H₁₁NO₃) (Merck 8382) 20 mM

17,9 g NaCl (Merck 6404) 0,3 M

1,0 g Rinder-Serum-Albumin (BSA, Sigma, A-4503)

1 ml Tween 80 (Merck 822187)

pH 7,5 mit 1 M HCl einstellen

Aqua bidest. ad 1000 ml

Haltbarkeit im Kühlschrank: 14 Tage

Sterilfiltration durch Spritzenfilter (Porengröße 1,2 µm)

Tween 20 Waschlösung

1 ml Tween 20 (Merck 822184)

Aqua bidest. ad 2000 ml lösen

Aufbewahrung im Kühlschrank

Standard-Verdünnungsreihe

Zunächst wurde 1 mg des getrockneten Progesteronlyophilisates in 1 ml Methanol eingewogen. Aus dieser Lösung wurden dann 100 µl entnommen und mit 900 µl AP aufgefüllt (100 µg P4 pro 1 ml Lösung). Anschließend wurde die Lösung 2 Minuten im Ultraschallbad gemischt und in Eppendorfreaktionsgefäße à 50 µl abgefüllt (25.000 pg P4/50 µl) und bei -20 °C gelagert (Stammlösung).

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurde ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 50 µl Stammlösung mit 150 µl AP aufgefüllt (1250 pg P4/10 µl) und gut auf dem Schüttler gemischt, danach 20 Minuten stehen gelassen (Standardlösung). Neun weitere Röhrchen standen

mit je 150 µl AP bereit, die in absteigender Reihenfolge nummeriert wurden (9-1). Aus der Standardlösung wurden 100 µl in das Röhrchen Nr. 9 pipettiert, von diesem 100 µl in das Röhrchen Nr. 8 usw. Der Verdünnungsfaktor hierbei betrug 1:2,5 und es ergaben sich die in Tabelle 6 aufgeführten Konzentrationen.

Tabelle 6: Progesteron-Konzentrationen für die Erstellung der Eichkurve

<i>Standardpunkt</i>	<i>Konzentration</i>
9	500 pg/10 µl
8	200 pg/10 µl
7	80,0 pg/10 µl
6	32,0 pg/10 µl
5	12,8 pg/10 µl
4	5,12 pg/10 µl
3	2,05 pg/10 µl
2	0,82 pg/10 µl
1	0,32 pg/10 µl

Gebrauchslösung für den Coating-Antikörper

1 ml des lyophilisierten Coating-Antikörpers wurde mit 1 ml Aqua bidest. versetzt und gut gemischt. Nach 20 Minuten Wartezeit wurden 250 ml Coating-Puffer hinzugegeben.

Gebrauchslösung für den Progesteron-Antikörper und das Enzymlabel

Die Antikörper-Lösung und das biotinylierte Progesteron wurden vom Hersteller als Lyophilisat geliefert. Der Antikörper wurde in Aqua bidest. aufgenommen und mit AP verdünnt, so dass er in einer Verdünnung von 1:15000 vorlag. Aus dem biotinylierten Progesteron wurde eine Verdünnung von 1:600000 hergestellt.

Diese beiden Ansätze mussten mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor sie weiterverwendet werden konnten.

Streptavidin-POD-Lösung

1 µl Streptavidin-POD-Konjugat (Roche 1089153, 500 U) wurde in 30 ml AP gelöst.

Substratlösung

TMB/Substrate Solution (Seramun Chargen- Nr. S-001-2) konnte direkt verwendet werden.

2 M H₂SO₄ als Stoppreagenz für TMB

10,89 ml hochprozentige Schwefelsäure (95-97%) (Merck 731)

89,11 ml Aqua bidest.

3.2.2 Beschichtung der Mikrotiterplatte

Für die Testdurchführung wurden F 96 Maxisorb Mikrotiterplatten aus Polypropylen von der Firma NUNC (Dänemark) verwendet.

Mit einer 8-Loch-Mehrkanalpipette wurden 250 µl der Coating-Antikörper-Gebrauchslösung in jede Kavität der Mikrotiterplatte eingefüllt und die Platte bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Danach wurde die Platte abgekippt und jede Kavität mit 300 µl sterilfiltriertem Gegencoatingpuffer (Blockpuffer) mit der 8-Loch-Mehrkanalpipette befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde dann mindestens 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Haftung des Schaf-anti-Kaninchen-Antikörpers an die Polypropylen-Oberfläche zu stabilisieren und um die freien Bindungsstellen an der Oberfläche mit Rinderserumalbumin zu blockieren. Danach konnte die Platte entweder bei -20 °C gelagert oder sofort für eine Testdurchführung verwendet werden. Bei -20 °C betrug die Verwendbarkeit der beschichteten Platte ein halbes Jahr. Vor der Verwendung musste die gelagerte Platte zunächst nach Erwärmung auf Zimmertemperatur viermal mit Tween-20-Waschlösung gewaschen und ausgeklopft werden. Die Waschlösung wurde mit einem Waschkamm (Nunc-Immuno Wash 12) in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gefüllt. Anschließend wurde die Platte auf Zellstoff ausgeklopft, um alle Rückstände zu entfernen.

3.2.3 Durchführung des Tests

Plattenbelegung

Die Mikrotiterplatten wurden in folgender Reihenfolge belegt (Abb. 4):

a) Kavität 1A bis C: unspezifische Bindung (B_U);

nicht-immunologische Bindung des biotinylierten Progesterons an den unspezifischen Beschichtungsantikörper. Selbst in Abwesenheit von hormonspezifischem Antikörper bindet eine sehr kleine Menge an den Beschichtungsantikörper.

- b) Kavität 1D bis F: maximale Bindung (B_0);
maximale Menge biotinyliertes Progesteron, die der spezifische Antikörper in Abwesenheit von nicht markiertem Antigen binden kann.
- c) Kavität 1G bis 5A: Standard S1 bis S9
- d) Kavität 5B bis 12E: Probe P1 bis P20
- e) Kavität 12F bis H: Kontrolle K (eine bekannte Konzentration)

Somit lagen auf der Platte B_U , B_0 , Standardpunkte, Proben und Kontrollen dreifach vor.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B_U	S1	S4	S7	S9	P3	P6	P8	P11	P14	P16	P19
B	B_U	S2	S4	S7	P1	P3	P6	P9	P11	P14	P17	P19
C	B_U	S2	S5	S7	P1	P4	P6	P9	P12	P14	P17	P20
D	B_0	S2	S5	S8	P1	P4	P7	P9	P12	P15	P17	P20
E	B_0	S3	S5	S8	P2	P4	P7	P10	P12	P15	P18	P20
F	B_0	S3	S6	S8	P2	P5	P7	P10	P13	P15	P18	K
G	S1	S3	S6	S9	P2	P5	P8	P10	P13	P16	P18	K
H	S1	S4	S6	S9	P3	P5	P8	P11	P13	P16	P19	K

Abbildung 4: Beschickung der 96 Kavitäten auf der Mikrotiterplatte (Dreifachbestimmungen)

B_U = unspezifische Bindung

B_0 = maximale Bindung

K = Kontrolle

P = Probe

S = Standardpunkt

Die Plattenbelegung (Tab. 7) begann mit dem Pipettieren von Assaypuffer in die B_U - und B_0 -Kavitäten. Hierfür wurde die Multipette plus der Firma Eppendorf mit entsprechenden Tipps verwendet. Anschließend wurden die Standardpunkte S1-S9, die Proben P1-P20 und die Kontrolle K aufgetragen. Dafür eignete sich eine feststehende Eppendorf-Pipette. Die Tipps wurden nach jeder Dreifachbelegung gewechselt. Es folgte die Zugabe von Assaypuffer in die Kavitäten für die Standardpunkte und die Proben mit der Multipette. Der nächste Arbeitsschritt war die Beschickung der Kavitäten, ausgenommen der B_U -Kavitäten, mit dem spezifischen Antikörper. Die Beschickung der Kavitäten endete zunächst mit der Zugabe des

biotinylierten Progesterons. Nun wurde die Platte mit Parafilm und Deckel luftdicht verschlossen und 18 bis 24 Stunden im Kühlschrank bei 350-450 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Tabelle 7: Arbeitsschritte und Mengenangaben zur Plattenbelegung (Dreifachbestimmungen)

Kavitäten		1.	2.	3.	4.
		Assaypuffer	Standard/Probe	Antikörper	biotinyliertes P4
B _U	3x	150 µl	–	–	100 µl
B ₀	3x	50 µl	–	100 µl	100 µl
S1-S9	27x	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl
P1-P20	60x	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl
K	3x	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl

B_U = unspezifische Bindung

B₀ = maximale Bindung

K = Kontrolle

P = Probe

P4 = Progesteron

S = Standardpunkt

Detektion

Nach dem Schütteln im Kühlschrank wurde die Platte nun viermal mit der Tween-20-Waschlösung gewaschen. Die Platte musste anschließend gründlich ausgeklopft werden. Danach wurden in jede Kavität 250 µl der Streptavidin-POD-Lösung mittels Multipette gegeben. Nach erneutem Verschluss mit Parafilm und Deckel wurde die Platte 45 min auf dem Schüttler im Kühlschrank geschüttelt. Im Anschluss daran wurde die Platte abgekippt und erneut viermal mit der Tween-20-Waschlösung gewaschen, wobei die Platte bei jedem Waschgang eine Minute auf dem Schüttler geschüttelt wurde. Nach gründlichem Ausklopfen der Platte wurde jede Kavität mit 250 µl TMB-Substrat-Lösung beschickt. Die Platte musste dann erneut 45 Minuten geschüttelt werden. Um die Enzym-Reaktion nach Ablauf der Wartezeit abzustoppen, wurden 50 µl einer 2 molaren H₂SO₄-Lösung in jede Kavität gegeben.

Messung

Die Messung der Progesteronkonzentrationen geschah innerhalb von 30 Minuten nach Abstoppen der Reaktionen. Dazu wurden das Messgerät zur optischen Dichte SLT-SPECTRA

der Firma Tecan und das Auswerteprogramm EIASTAR verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Zuverlässigkeit der Methode

Nach Schwarzenberger et al. (1993a) liegt die untere Nachweisgrenze bei 2 pg und die obere Nachweisgrenze bei 500 pg. In den eigenen Untersuchungen errechnete das EIASTAR-Programm Messwerte zwischen 1 und 2547 pg (siehe Kapitel 9), wobei die höchste angestrebte Konzentration bei ca. 150 pg/10 µl liegen sollte. Da sich beim EIASTAR-Programm Fehler schnell fortpflanzen und sich stark auf die Konzentrationsberechnung auswirken, wurde zusätzlich eine Berechnung der Konzentrationen auf der Grundlage einer logistischen Funktion durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Die so errechneten Konzentrationen lagen zwischen 432,33 pg und 0,03 pg. Messwerte, die im EIASTAR-Programm als <min angegeben wurden, wurden mit 0,00 gleichgesetzt.

Der Variationskoeffizient für den Intra- bzw. Interassay liegt nach eigenen Untersuchungen bei 11,4 % bzw. 38,9 %. Für den Intraassay wurde eine Mikrotiterplatte angefertigt, auf der nur die Ausgangskonzentration einer Testlösung von Progesteron im Flusswasser untersucht wurde. Es wurden 17 Progesteronkonzentrationen zur Berechnung des Variationskoeffizienten herangezogen. Für den Variationskoeffizienten des Interassays wurden die Kontrollkonzentrationen von 24 verschiedenen Platten herangezogen.

3.2.4 Anordnung der Versuchsvarianten auf der Mikrotiterplatte

Für die vergleichende Betrachtung der Messergebnisse der Varianten eines Versuches untereinander wurden die einzelnen Varianten in bestimmten Kombinationen auf die Platten gegeben (Tab. 8, 9, 10).

Für die Proben standen auf der Mikrotiterplatte 60 Kavitäten zur Verfügung. Da Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden, konnten insgesamt 20 Proben gleichzeitig gemessen werden.

Tabelle 8: Anordnung der Varianten von Versuch 1 auf den Platten

Variante	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Platte 4
FW mit P4 (5 °C)	x	–	x	–
FW mit P4 (20 °C)	x	–	x	x
Sterilisiertes FW mit P4 (5 °C)	–	x	x	x
Sterilisiertes FW mit P4 (20 °C)	–	x	–	x
Aqua bidest. mit P4 (20 °C)	x	x	–	–
FW ohne P4 (20 °C)	x	x	–	–

FW = Flusswasser

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

Tabelle 9: Anordnung der Varianten von Versuch 2 auf den Platten

Variante	Platte 1	Platte 2	Platte 3
Sterilisiertes FW mit BS und P4 (5 °C)	x	x	x
Sterilisiertes FW mit BS und P4 (20 °C)	x	–	x
Aqua bidest. mit BS und P4 (5 °C)	x	x	–
Aqua bidest. mit BS ohne P4 (20 °C)	–	x	x

BS = Belebtschlamm

FW = Flusswasser

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

Tabelle 10: Anordnung der Varianten von Versuch 3 auf den Platten

Variante	Platte 1	Platte 2
Sterilisiertes FW mit <i>A. sobria</i> und P4	x	–
Sterilisiertes NaCl mit <i>A. sobria</i> und P4	x	x
Sterilisiertes FW mit <i>E. coli</i> und P4	x	x
Sterilisiertes NaCl mit <i>E. coli</i> und P4	–	x

FW = Flusswasser

NaCl = NaCl-Lösung

P4 = Progesteron

x = untersucht

– = nicht untersucht

3.3 Bakteriologische Untersuchung zur Bestimmung der Koloniezahl

Die Entwicklung der Koloniezahl der Proben aller Ansätze wurde am Tag 0 sowie an den Tagen 8 und 28 bzw. 16 (Variante 3 von Versuch 1) überprüft. Die Ansätze wurden zunächst in einer Verdünnungsreihe vorverdünnt. Es wurde 1 ml Probe zu 9 ml NaCl-Lösung gegeben und gut vermischt (Verdünnungsstufe 10^1). Aus dieser Lösung wurde erneut 1 ml entnommen und ebenfalls in 9 ml NaCl-Lösung gegeben. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis die erwünschte Stufe erreicht war. In der Regel wurden 10 μ l einer Verdünnungsstufe zwischen 10^2 und 10^5 auf Standard-I-Agar und auf Blut-Agar aufgetragen und die Koloniezahl am nächsten Tag nach Inkubation bestimmt.

Für die Sterilkontrollen wurden je 10 μ l der Probe auf Standard-I-Agar und Blut-Agar gegeben und mit einem zuvor abgeflamten Glasspatel verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurde die Sterilität überprüft.

3.4 Berechnung der Progesteronkonzentrationen

Die Berechnung der Progesteronkonzentrationen erfolgte zum einen mit dem Programm EIASTAR und zum anderen auf der Grundlage einer logistischen Funktion mit Hilfe des Statistikprogramms STATISTICA. Die logistische Funktion wird im Folgenden näher erläutert. Die Progesteronkonzentrationen wurden aus den gemessenen optischen Dichten (OD) bestimmt. Die Eichung (Kalibration) erfolgte durch Verknüpfung bekannter Konzentrationen und den zugehörigen OD-Werten. Diese Verknüpfung wurde der Berechnung der unbekannteren Progesteronkonzentrationen zugrunde gelegt.

Im EIASTAR-Programm erfolgte zunächst eine Umrechnung der OD-Werte in prozentuale Bindungen. Dabei wurden die Mittelwerte der gemessenen OD-Werte der maximalen Bindung (B_0) als 100 %-Wert definiert. Die übrigen Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Die erhaltenen prozentualen Bindungen wurden anstelle der OD-Werte zur Kalibration und Bestimmung der unbekannteren Konzentrationen verwendet. Diese Transformation eignet sich, um Schwankungen der einzelnen Messwerte von Platte zu Platte auszugleichen. Sie ist bei folgenden Voraussetzungen gerechtfertigt:

1. Die Streuung der 3 B_0 -Werte ist gering.
2. Die zu beurteilenden OD-Messwerte sind deutlich kleiner als die maximale Bindung (höchstens 80 % von B_0).

3. Die zu beurteilenden OD-Messwerte sind deutlich größer als die Werte der unspezifischen Bindung (um mindestens 20 % von B_U).

Bei der Untersuchung des Verlaufes der Hormonkonzentrationen traten Werte auf, die unterhalb der 20 %- bzw. oberhalb der 80 %-Grenze lagen. Damit war die Verlaufskurvenbestimmung in diesen Bereichen besonders fehleranfällig, weil Einzelwerte nicht mehr korrekt interpretiert werden konnten. Durch die Umrechnung der OD-Werte in prozentuale Werte wurden Fehler der B_0 -Werte auf die Konzentrationsberechnung übertragen. Besonders OD-Werte $> B_0$ und $< B_U$ führten zu Ausfällen bei der Konzentrationsberechnung. Derartige Messfehler könnten beispielsweise durch Ungenauigkeiten beim Herstellen der Lösungen und Verdünnungen sowie beim Pipettieren zur Plattenbelegung entstanden sein. Insbesondere manuelle Schritte bei der Methodendurchführung könnten Fehler bewirkt haben.

Um für die Berechnung der Progesteronkonzentrationen den Einfluss der Messwertschwankungen zu reduzieren und die Zahl der Ausfälle zu verringern wurden folgende Prämissen gesetzt:

1. Das arithmetische Mittel der OD-Werte wird durch den Median der OD-Werte ersetzt, weil dieser einzelne Messfehler verzerrungsfrei eliminiert.
2. Die Kalibration wird direkt zwischen den Medianen der OD-Werte und den Konzentrationsstufen vorgenommen.
3. Die Werte der unspezifischen Bindung B_U und der maximalen Bindung B_0 werden nur als Kontrollwerte für die erhaltenen Funktionen bei der Kalibration verwendet.

Unter Berücksichtigung dieser Prämissen wurde für die Interpretation der Messergebnisse neben der Anwendung des EIASTAR-Programms die Kalibration und Konzentrationsberechnung auf der Grundlage einer logistischen Funktion mit Hilfe des STATISTIKA-Programms durchgeführt:

Als erster Schritt erfolgte die Bestimmung der Eichkurve (Kalibration). Mit einer logistischen Funktion wurde eine Regression der OD-Werte (Mediane) auf die Konzentrationsstufen S ($S = S_1, \dots, S_9$) der Standardpunkte durchgeführt (Formel 1).

$$OD(S) = a / (1 + \exp(b + c * S)) \quad (\text{Formel 1})$$

Damit wurde die Beziehung zwischen den Standardpunkten und den OD-Werten hergestellt. Durch die Anpassung an die logistische Funktion wurden die Koeffizienten a , b und c ge-

schätzt, aus denen sich die Kalibrationsfunktion ergab. Durch Umstellung der Formel 1 bezüglich S ergab sich ein S-Wert entsprechend Formel 2.

$$\hat{S} = S(\text{OD}) = (\ln(\hat{a} / \text{OD} - 1) - \hat{b}) / \hat{c} \text{ (Formel 2)}$$

Dieser S-Wert gibt die Konzentration nicht mehr in Stufen wieder (wie bei der Standardkurve), sondern lässt sich aus der rechten Seite der Formel 2 für jeden OD-Wert als reelle Zahl erhalten. Die Konzentrationsstufe S variiert also stetig. Schließlich wurden die unbekannt Konzentrationen der Progesteronproben mit Hilfe des reellen S-Wertes aus Formel 2 nach Formel 3 berechnet.

$$K = (2,5)^{\hat{S}} * 0,131072 \text{ (Formel 3)}$$

OD(S) = OD = gemessene OD-Werte

S = bekannte Konzentrationsstufen (S = S₁, ..., S₉) bzw. reeller Wert

$\hat{S} = S(\text{OD})$ = kalibrierte Konzentrationen

\hat{a} , \hat{b} , \hat{c} = geschätzte Koeffizienten

K = Konzentration der Proben

Um die Anpassung der Messergebnisse an die beiden unterschiedlichen Kalibrationsmethoden zu veranschaulichen, ist in Abbildung 5 und 6 beispielhaft eine Standardkurve sowohl nach dem EIASTAR-Programm (Abb. 5) als auch mit logistischer Funktion (Abb. 6) dargestellt.

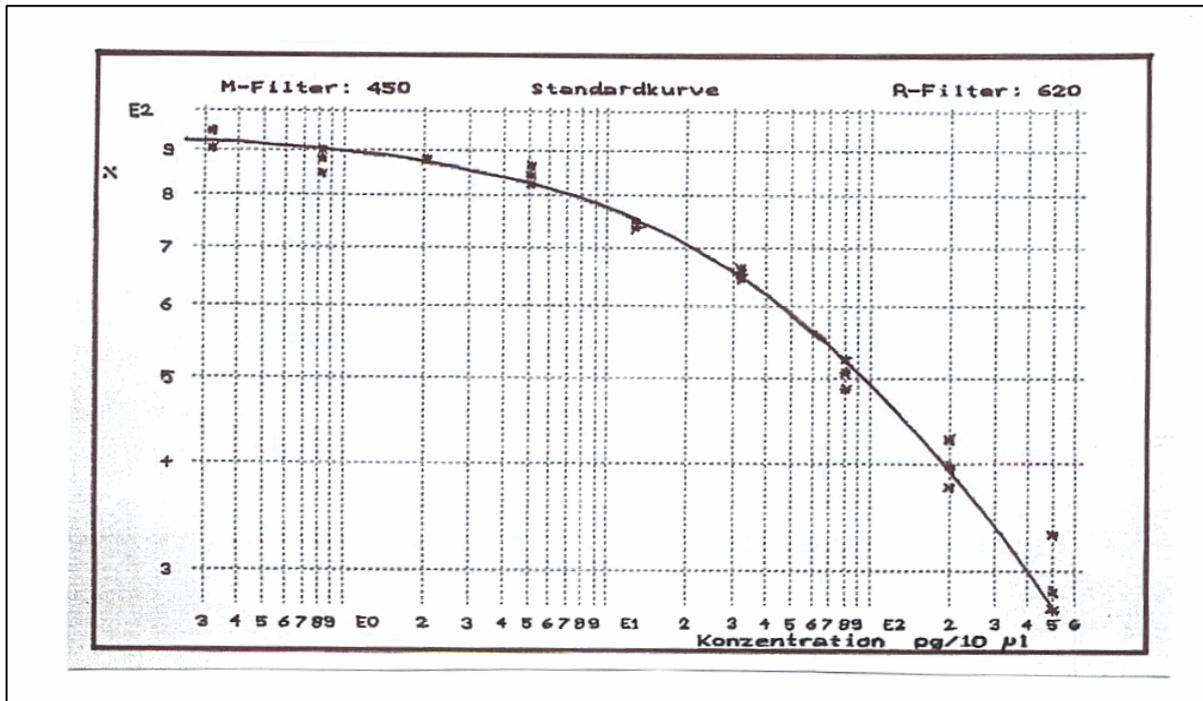


Abbildung 5: Beispiel einer Standardkurve nach dem EIASTAR-Programm; x-Achse logarithmisch geteilt, y-Achse gibt die prozentuale Bindung der Standardpunkte in Bezug auf die maximale Bindung (B_0) an

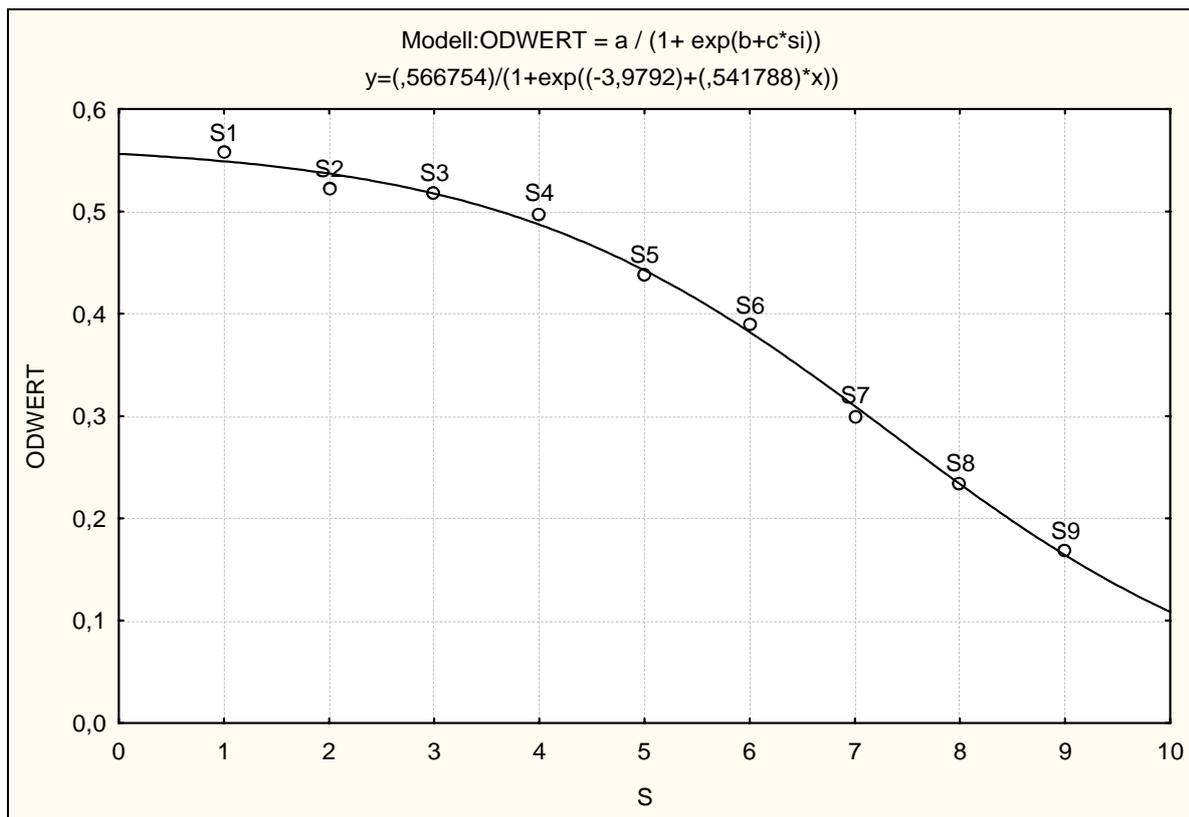


Abbildung 6: Standardkurve derselben Platte wie in Abb. 5 mit logistischer Funktion; x- Achse beschreibt die Standardpunkte, y-Achse enthält die dazugehörigen OD-Werte

Obwohl die Skalierungen der Achsen beider Abbildungen unterschiedlich sind, können sie in der Datenanpassung miteinander verglichen werden.

Die Kurve des EIASTAR-Programmes wird auf der x-Achse einer logarithmischen Skala angepasst, die die Konzentration in $\text{pg}/10 \mu\text{l}$ angibt. Auf der y-Achse wird die prozentuale Bindung im Verhältnis zur maximalen Bindung abgelesen. Im Gegensatz dazu wird bei der logistischen Funktion der gemessene OD-Wert auf der y-Achse mit dem entsprechenden Standardpunkt (Konzentrationsstufe) auf der x-Achse in Verbindung gebracht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Konzentration jedes einzelnen Standardpunktes bekannt und konstant ist (vgl. Tab. 6). Über die OD-Werte der Proben kann dann mit Hilfe des entsprechenden Standardpunktes die Konzentration der Probe ermittelt werden.

Während in Abbildung 5 ein sigmoider Charakter der Standardkurve nicht erkennbar ist, zeigt die Abbildung 6 einen sigmoiden Verlauf, der durch die Anwesenheit eines Wendepunktes in der Nähe des Standardpunktes 7 offensichtlich ist. Die Konzentration wird hierbei durch Konzentrationsstufen vermittelt. Für die Konzentrationsstufen ergibt sich eine lineare Skala.

Durch Anwendung der logistischen Funktion wird eine bessere Anpassung an den Verlauf der Standardkurve erreicht. Die Anwendung des Medians korrigiert einzelne abweichende Werte automatisch.