

4. ERGEBNISSE

4.1 Vorbemerkungen

Zur besseren Zuordnung der Ergebnisse wird der Versuchsaufbau noch einmal kurz beschrieben. Das Datenmaterial wurde in drei Versuchen gewonnen. Jeder einzelne Versuch bestand aus mehreren Varianten.

Versuch 1: Abbau von Progesteron im Flusswasser mit den Varianten 1 bis 4

Versuch 2: Abbau von Progesteron im Flusswasser mit Zusatz von Belebtschlamm mit den Varianten 1 bis 3

Versuch 3: Abbau von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser durch einzelne Bakterienpezies mit den Varianten 1a und b sowie 2a und b

Wie bereits im Kapitel 3 beschrieben, wurden alle Versuche mit ihren jeweiligen Varianten dreimal durchgeführt, d. h. von jeder Variante gab es drei Ansätze (vgl. Kapitel 3, Tab. 1). Innerhalb der Ansätze wurde die P4-Konzentration jeder einzelnen Probe zwei- bis sechsmal mittels ELISA gemessen (Wiederholungsmessungen). Jeder Einzelmesswert wurde mit Hilfe der Dreifachbestimmung im ELISA ermittelt (vgl. Kapitel 3.2.3).

Bei der Beschreibung der Ergebnisse in den drei Versuchen wird folgendermaßen vorgegangen:

- Berechnung des Konzentrationsverlaufs mit dem EIASTAR-Programm
- prozentualer Konzentrationsverlauf in Bezug auf den Ausgangswert
- Konzentrationsberechnung durch logistische Funktion
- Vergleich der durch eine logistische Funktion berechneten Konzentrationsverläufe mehrerer Varianten auf einer Platte

Für die Darstellung des prozentualen Konzentrationsverlaufes werden die Ausgangskonzentrationen, die mit Hilfe der EIASTAR-Berechnung ermittelt wurden, jeweils als 100 %-Wert

gesetzt und der Konzentrationsverlauf dann prozentual zum Ausgangswert berechnet. Damit können die Verläufe der einzelnen Versuche miteinander verglichen werden.

Die „Abbaustufe 10 %“ wird als „cut off“ für den hinreichenden Progesteronabbau gewählt. Unter dieser Grenze von 10 % können die Messwerte nicht mehr quantitativ beurteilt werden, weil sie außerhalb der Erkennungsgrenze von 20 % der maximalen Bindung (B_0) liegen.

Bei der Datenanalyse zeigte sich, dass es große Schwankungen innerhalb der Messwerte gab (Tab. 1). Sowohl zwischen den einzelnen Ansätzen als auch bei den Wiederholungsmessungen der einzelnen Proben innerhalb der Ansätze kam es zu unerwartet großen Streuungen. Um dieses Problem zu verdeutlichen, ist in der Tabelle 1 beispielhaft der gemittelte Konzentrationsverlauf von P4 im Flusswasser bei 5 °C (Var. 1) im 1. Ansatz des 1. Versuches aufgeführt. Die Konzentration jeder Probe dieses Ansatzes wurde viermal bestimmt (Wiederholungsmessungen, $N = 4$). Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte auf der Grundlage des EIASTAR-Programmes.

Tabelle 1: Beispiel eines mit dem EIASTAR-Programm berechneten Verlaufs der Progesteronkonzentration im Flusswasser bei 5 °C (Versuch 1, Variante 1, Ansatz 1)

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	4	245,0625	154,44609
1	4	172,3725	143,21871
2	4	122,5300	67,67616
4	4	50,6075	34,71431
8	4	1,2775	1,60512
16	4	2,1325	0,64428
28	4	1,7125	1,28129

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Wegen der hohen Streuungen (siehe Standardabweichung s) wurde wie im Kapitel 3 beschrieben eine weitere Kalibrationsmethode verwendet, die den Einfluss stark abweichender Werte reduziert. Beim Abtragen der OD-Werte (Mediane) über die Konzentrationsstufen ergab sich für die Kalibrationskurve ein stabiler sigmoider Verlauf. Die Anpassung zwischen

OD-Werten und Konzentrationsstufen erfolgte mit einer dreiparametrischen logistischen Regressionsfunktion (vgl. Kapitel 3.4, Formel 1).

Wie in Tabelle 2 deutlich wird, erzeugte die Berechnung der Konzentration von Progesteron im Flusswasser bei 5 °C im 1. Ansatz von Versuch 1 auf der Grundlage der mit Hilfe der logistischen Funktion erstellten Kalibrationskurve eine geringere Streuung als mit dem EIASTAR-Programm (Tab. 1), besonders bei hohen Messwerten.

Tabelle 2: Beispiel eines mit einer logistischen Funktion berechneten Verlaufs der Progesteronkonzentration im Flusswasser bei 5 °C (Versuch 1, Variante 1, Ansatz 1)

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	4	184,6388	69,59589
1	4	130,6519	45,35352
2	4	131,2956	42,67928
4	4	79,2373	39,60313
8	4	2,8583	3,71076
16	4	3,6056	2,91304
28	4	3,2506	2,97567

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Aber nicht nur die Streuung wird durch die logistische Funktion beeinflusst, sondern auch die ermittelten mittleren Konzentrationen. Bei Anwendung des EIASTAR-Programmes liegen die Mittelwerte bei hohen Konzentrationen zu Versuchsbeginn höher als bei der Berechnung mit logistischer Funktion (siehe Tabelle 2 im Vergleich zu Tabelle 1).

4.2 Verlaufsuntersuchungen zur Progesteronkonzentration im Flusswasser (Versuch 1)

Im Versuch 1 wurde der Konzentrationsverlauf von Progesteron (P4) im Flusswasser sowie in sterilisiertem Flusswasser und Aqua bidest. untersucht. Weiterhin wurde kontrolliert, ob in originärem Flusswasser Progesteron enthalten ist. Entsprechend wurde der Versuch in vier Varianten unterteilt:

- Variante 1: Flusswasser mit P4, Lagerung bei 5 °C und 20 °C bis zum 28. Tag
- Variante 2: sterilisiertes Flusswasser, Lagerung mit P4 bei 5 °C und 20 °C bis zum 28. Tag
- Variante 3: Aqua bidest. mit P4, Lagerung bei 20 °C bis zum 16. Tag
- Variante 4: Flusswasser ohne P4-Zusatz, Lagerung bei 20 °C bis zum 16. Tag

Am Tag 0, 8 und 28 wurde die Koloniezahl im Flusswasser bestimmt bzw. die Sterilität der sterilisierten Ansätze überprüft.

4.2.1 Berechnung des Konzentrationsverlaufes mit dem EIASTAR-Programm

Bei der Auswertung der Daten stellte sich heraus, dass das EIASTAR-Programm OD-Werte, die kleiner als die OD-Werte der unspezifischen Bindung B_U waren, nicht berechnen konnte und die Konzentrationen mit „<min“ angab. Für die Auswertung wurden die „<min“-Werte auf Null gesetzt. Für eine Übersichtsdarstellung der Konzentrationsverläufe wurden die mit dem EIASTAR-Programm berechneten Werte angewendet (arithmetisches Mittel \bar{x} , Standardabweichung s). Die in Tabelle 3 bis 6 angegebenen Mittelwerte der Progesteronkonzentrationen geben den charakteristischen Konzentrationsverlauf der einzelnen Versuchsvarianten wieder. Die Mittelwertbildung umfasst die drei Ansätze der jeweiligen Variante sowie die Messwiederholungen der einzelnen Proben (Einzelmesswerte siehe Kapitel 9, Tab. 1). Im Flusswasser (Var. 1) fällt die mittlere Progesteronkonzentration nach 28 Tagen von ausgangs 166 pg/10 μ l bei 5 °C bzw. 183 pg/10 μ l bei 20 °C auf 1,5 bzw. 1,6 pg/10 μ l ab. Dieser Konzentrationsabfall verläuft bei 20 °C Lagerungstemperatur schneller als bei 5 °C (Tab. 3).

Tabelle 3: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron im Flusswasser (Var. 1) bei 5 °C und 20 °C

Tag	5 °C				20 °C		
	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s		N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	12	166,3042	108,22235		13	183,2100	165,42210
1	12	120,8342	97,68717		13	4,8285	4,29993
2	12	98,2350	56,76117		13	1,5238	1,18206
4	12	33,8933	31,71008		13	1,5646	1,37296
8	12	1,9550	1,32852		13	1,3054	1,03190
16	12	1,6908	0,96104		13	1,2769	1,03967
28	12	1,5350	1,19270		13	1,6508	1,49340

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

In sterilisiertem Flusswasser (Var. 2) bleibt die Progesteronkonzentration innerhalb der 28 Versuchstage annähernd auf dem Niveau des Ausgangswertes von 164 pg/10 μ l bei 5 °C bzw. 233 pg/10 μ l bei 20 °C (Tab. 4). Es kommt sowohl bei 5 °C als auch bei 20 °C Lagerungstemperatur zu Schwankungen der Konzentration sowohl über als auch unter den Ausgangswert (Tab. 4), wobei besonders bei der 20 °C-Lagerung das Unterschreiten der Ausgangskonzentration am Ende des Versuches auffällt.

Tabelle 4: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser (Var. 2) bei 5 °C und 20 °C

Tag	5 °C				20 °C		
	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s		N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	12	164,5400	106,03253		11	233,6591	215,56764
1	12	202,8975	214,52032		11	280,0345	279,25254
2	12	204,9542	173,39915		11	221,3373	210,74927
4	12	173,7858	157,44425		11	195,1373	176,92972
8	12	190,4850	206,87137		11	241,6100	277,64656
16	12	158,1767	101,35259		11	188,2636	164,85240
28	12	154,1975	125,88101		11	189,3282	227,71879

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Auch im Aqua bidest. liegen die Progesteronkonzentrationen auf annähernd gleichem Niveau (Tab. 5). Zum Ende des Versuches fällt die Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert leicht ab.

Tabelle 5: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron in Aqua bidest. (Var. 3) bei 20 °C

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	12	202,0775	172,06564
8	12	216,6292	266,02730
16	12	161,4592	192,52752

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Die in Tabelle 6 aufgeführten P4-Konzentrationen im Flusswasser ohne P4-Zusatz (Var. 4) liegen unter 2 pg/10 μ l. Damit liegen sie außerhalb der definierten Erkennungsgrenzen (Kapitel 3.4) bzw. außerhalb der nach Schwarzenberger et al. (1993a) angegebenen Nachweisgrenze (Kapitel 3.2.3) und sind nicht interpretierbar.

Tabelle 6: Gemittelte Konzentration (EIASTAR-Programm) von Progesteron im Flusswasser ohne Progesteronzusatz (Var. 4) bei 20 °C

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	12	1,6117	1,38481
8	12	1,9183	1,71451
16	12	1,5033	1,22218

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

4.2.2 Prozentualer Konzentrationsverlauf in Bezug auf den Ausgangswert

Um den Verlauf von Progesteron im Flusswasser mit dem Verlauf in sterilisiertem Flusswasser zu vergleichen, bietet sich die Darstellung des prozentualen Verlaufs (Abb. 1.) an.

Bei 20 °C unterschreitet P4 im Flusswasser 10 % der Ausgangskonzentration bereits am Tag 1, während bei 5 °C diese Stufe erst um den 6. Tag erreicht wird. Der Zeitpunkt kann in diesem Fall nicht konkreter benannt werden, weil er zwischen zwei Messungen liegt (zwischen Tag 4 und 8). Es fällt auf, dass bei den sterilen Ansätzen (Var. 2) der Ausgangswert von 100 % nur geringgradig unterschritten, aber mehrfach überschritten wird (Abb. 1). Neben den Schwankungen zeigt sich die Tendenz einer leichten Konzentrationsreduzierung am Ende des Versuchszeitraumes insbesondere bei 20 °C Lagerungstemperatur.

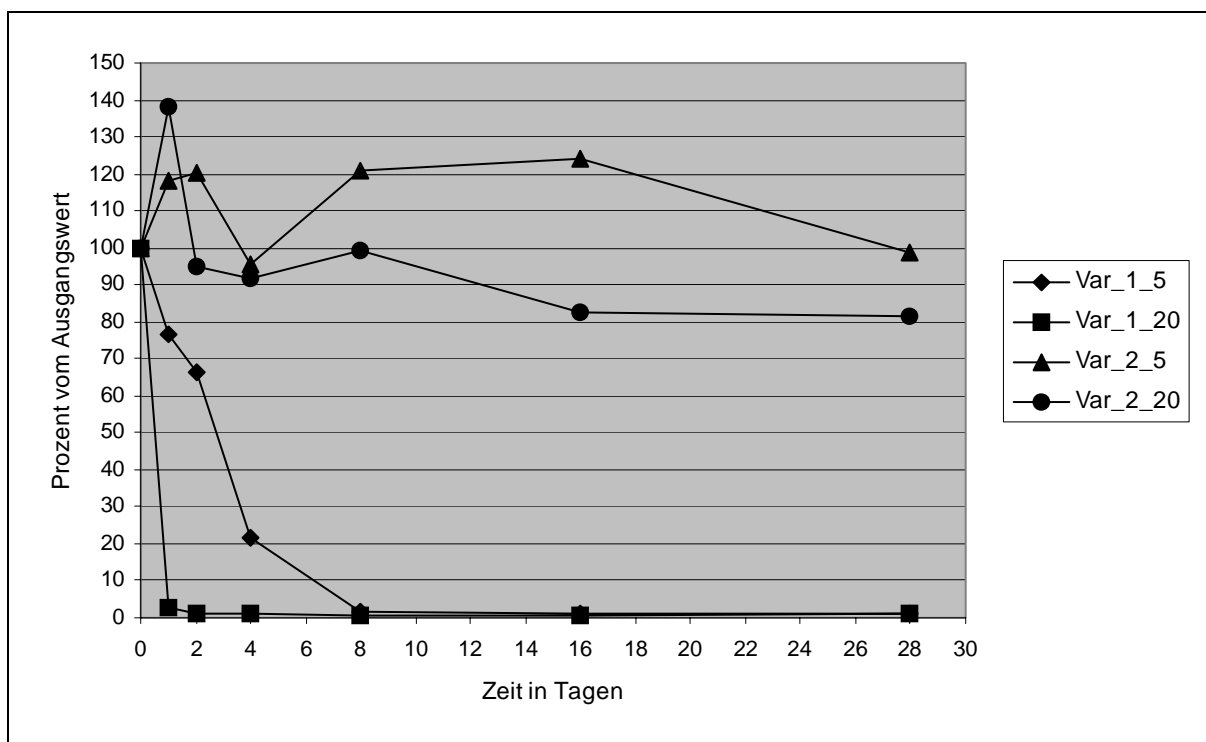


Abbildung 1: Gemittelter prozentualer Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron im Flusswasser (Var. 1) und in sterilisiertem Flusswasser (Var. 2) bei 5 °C und 20 °C

Var_1_5: Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C

Var_1_20: Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C

Var_2_5: Sterilisiertes Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C

Var_2_20: Sterilisiertes Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C

4.2.3 Konzentrationsberechnung mit logistischer Funktion

Für die detaillierte Betrachtung der einzelnen Ansätze des Versuchs 1 eigneten sich die mit der logistischen Funktion berechneten Konzentrationen besser als die mit dem EIASTAR-Programm berechneten. Die Streuung konnte im Vergleich zur Konzentrationsberechnung mit dem EIASTAR-Programm verringert werden. Bei der Berechnung waren die Daten Transformationen unterworfen, bei denen schiefe Verteilungen und Ausreißer auftraten. Besser war die Medianbildung für die Mittelung geeignet. Die dargestellten Boxplots in Abbildung 2 zeigen den Konzentrationsverlauf von Progesteron im Flusswasser. Für die Abbildung 2 wurde der 3. Ansatz der Variante 1 des 1. Versuches ausgewählt, die Ansätze 1 und 2 stellen sich ähnlich dar (vgl. Kapitel 9, Tab. 1). In jeden Boxplot der Abbildung 2 gehen 4 bzw. 5 Messwerte zu derselben Probe ein ($N = 4$ bzw. 5), d. h. jede Probe wurde vier- bzw. fünfmal auf unterschiedlichen ELISA-Platten gemessen. Der Verlauf des Medianwertes in den Boxplots gibt den typischen temperaturabhängigen Progesteronabbau wieder. Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass das Messen derselben Probe auf unterschiedlichen Platten die Reproduzierbarkeit der Messung beeinflusst, was auch beim Vergleich der Variationskoeffizienten im Intra- und Interassay zum Ausdruck kommt (siehe Kapitel 3.2.3).

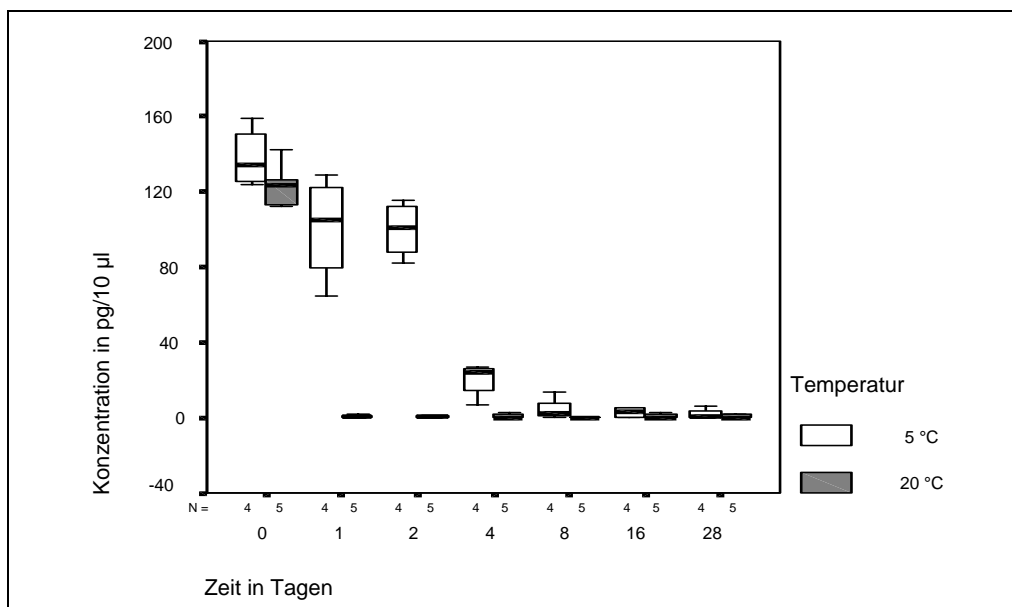


Abbildung 2: Vergleich des Konzentrationsverlaufes (logistische Funktion) von Progesteron im Flusswasser bei 5 °C und 20 °C (Versuch 1, Var. 1, Ansatz 3)

In Abbildung 3 wird sowohl die Streuung der mit logistischer Funktion ermittelten Konzentrationen von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser (3. Ansatz der Variante 2 des 1. Versuches) als auch die Schwankung des Konzentrationsverlaufes deutlich. Die Progesteronkonzentration bleibt bei 20 °C auf einem gleichmäßigen Niveau. Dem entgegen liegen die Mediane der Konzentrationen bei 5 °C an den Tagen 16 und 28 etwas niedriger als an den Tagen zuvor. Es zeigt sich bei der Betrachtung eines einzelnen Ansatzes damit ein ähnliches Bild wie bei der Betrachtung der Mittelwerte über alle Ansätze (vgl. Abb. 1). Die Ansätze 1 und 2 stellen sich ähnlich dar (siehe Kapitel 9, Tab. 2).

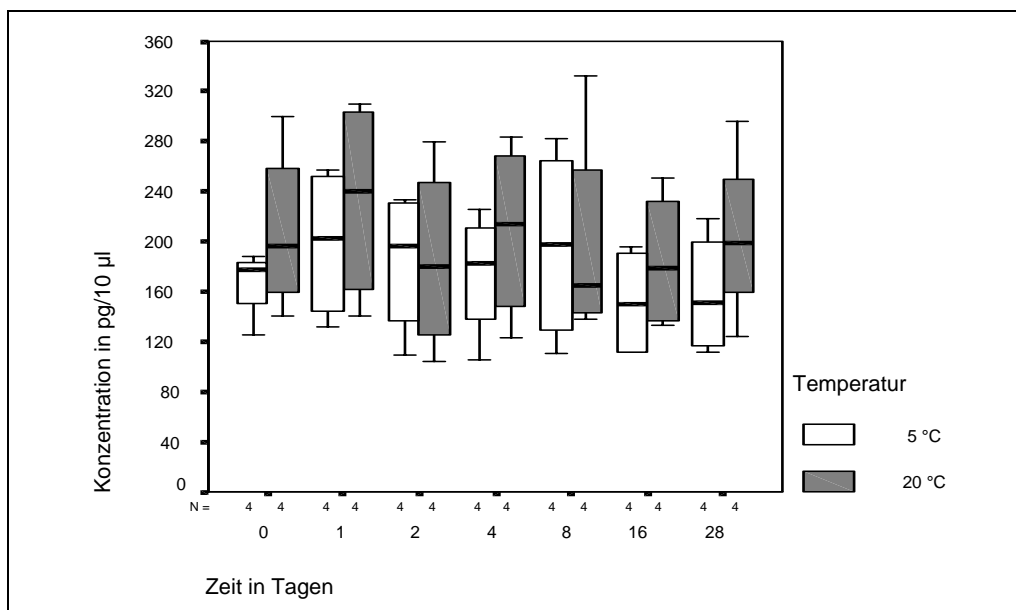


Abbildung 3: Vergleich des Konzentrationsverlaufes (logistische Funktion) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser bei 5 °C und 20 °C (Versuch 1, Var. 2, Ansatz 3)

4.2.4 Vergleich der Konzentrationsverläufe mehrerer Varianten auf einer Platte

Um noch einen Schritt weiter ins Detail zu gehen, werden im Folgenden beispielhaft zwei Platten (A und B) ausgewählt, die den direkten Vergleich des Konzentrationsverlaufes einzelner Varianten auf derselben Platte ermöglichen (vgl. Kapitel 3.2.4). Die Konzentrationen wurden mit einer logistischen Funktion berechnet. Auf einer Platte konnten maximal drei Verläufe gleichzeitig gemessen werden. Die Messwerte sind Medianwerte aus Dreifachbestimmungen.

Die Ausgangskonzentrationen von Progesteron auf Platte A (Abb. 4) liegen im Flusswasser bei etwa 125 pg/10 µl und fallen bei 20 °C am Tag 1 und bei 5 °C am Tag 8 auf die Nulllinie ab. In sterilisiertem Flusswasser schwankt die Konzentration, fällt aber nicht ab (bei 5 °C).

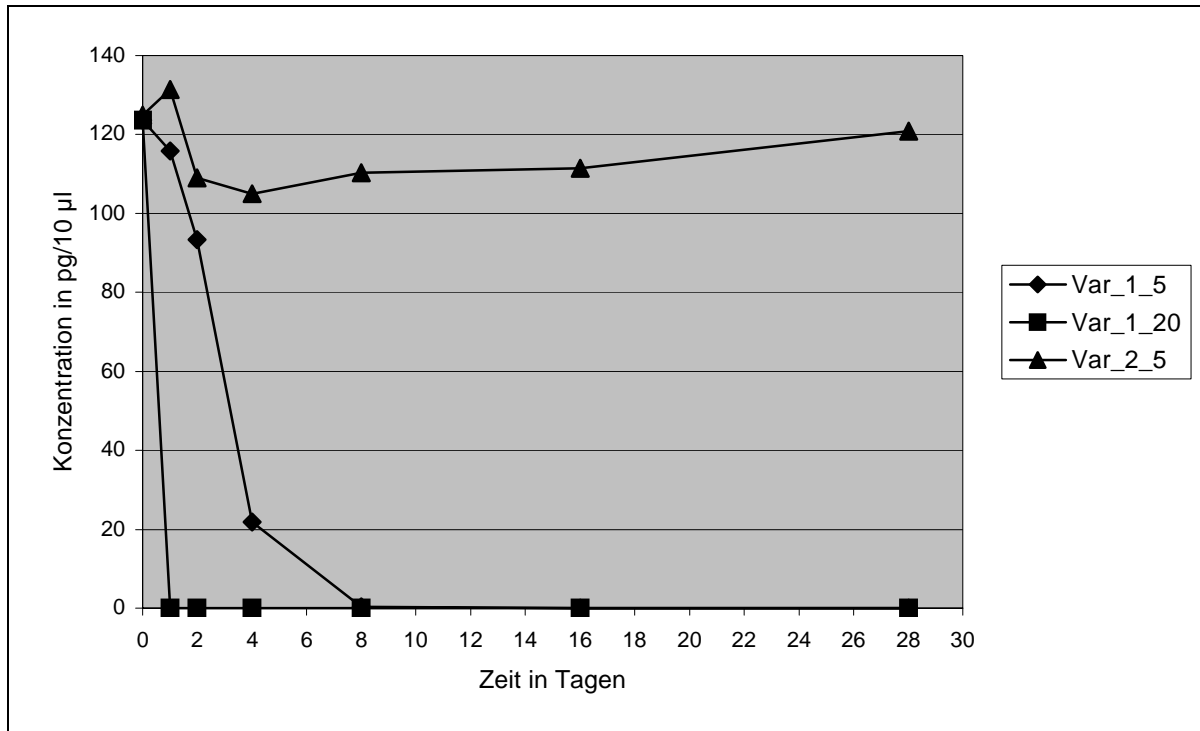


Abbildung 4: Vergleich des Konzentrationsverlaufes (logistische Funktion) von Progesteron im Flusswasser bei 5 °C und 20 °C sowie in sterilisiertem Flusswasser bei 5 °C auf derselben ELISA-Platte (Platte A)

Var_1_5: Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C

Var_1_20: Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C

Var_2_5: Sterilisiertes Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C

Der Vergleich der sterilisierten Ansätze (Abb. 5) zeigt auf der Platte B einen leichten Abfall von ausgangs ca. 180 pg/10 µl auf Werte zwischen 110 pg/10 µl (bei 5 °C) und 130 pg/10 µl (bei 20 °C), während bei nicht sterilisiertem Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C die Progesteronkonzentration am Tag 1 auf Null abfällt (bei 20 °C). Der leichte Konzentrationsabfall bei der sterilisierten Variante ist bei 20 °C ausgeprägter als bei 5 °C.

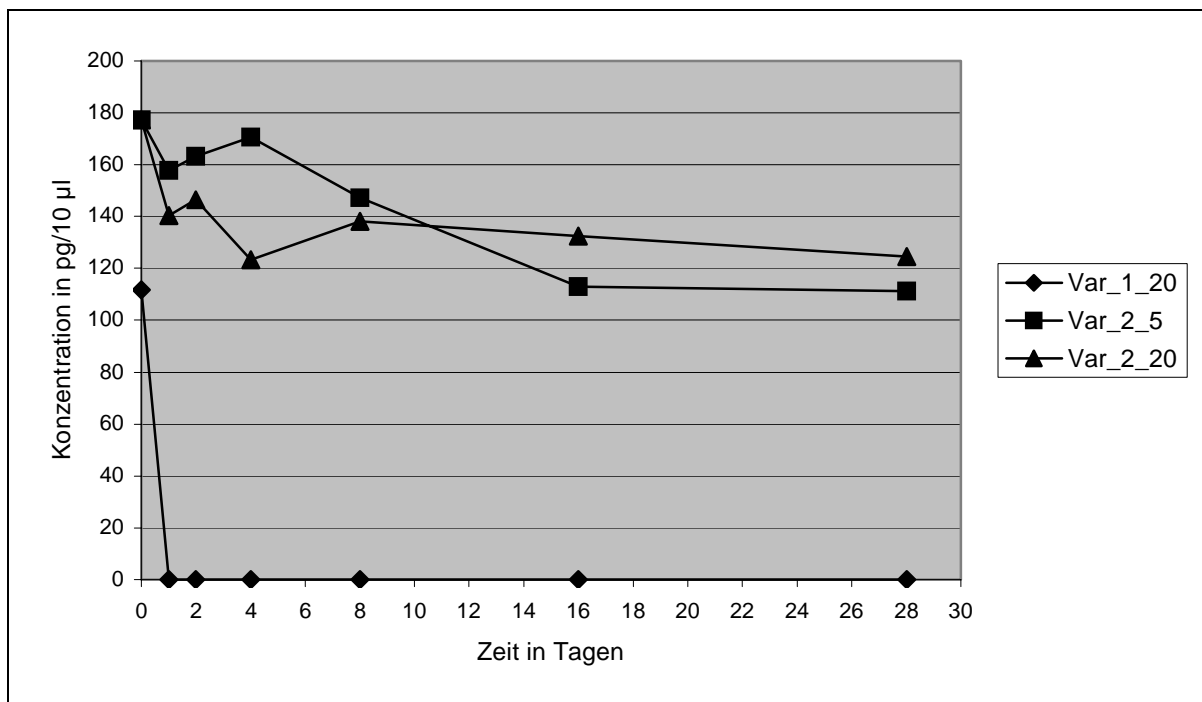


Abbildung 5: Vergleich des Konzentrationsverlaufes (logistische Funktion) von Progesteron in Flusswasser bei 5 °C und 20 °C sowie in sterilisiertem Flusswasser bei 5 °C auf derselben ELISA-Platte (Platte B)

Var_1_20: Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C

Var_2_5: Sterilisiertes Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C

Var_2_20: Sterilisiertes Flusswasser mit Progesteron bei 20 °C

4.2.5 Bakteriologische Untersuchung

Zu Beginn, am Tag 8 und am Ende des Versuchszeitraumes wurden Bestimmungen der Koloniezahl bei den einzelnen Varianten durchgeführt. Für die sterilisierten Ansätze bedeutete die bakteriologische Untersuchung eine Kontrolle der Sterilität. Es wurden Mittelwerte aus allen Koloniezahlbestimmungen der jeweiligen Varianten in allen drei Ansätzen gebildet (Tab. 7). Flusswasser mit Progesteron zeigt ausgehend von $1,7 \cdot 10^3$ KbE/ml (Standard I-Agar) bzw. $1,9 \cdot 10^3$ KbE/ml (Blut-Agar) am Tag 8 eine Erhöhung der Koloniezahl, die bei 20 °C stärker ist als bei 5 °C. Das bedeutet, dass das Keimwachstum bei 20 °C Lagerungstemperatur höher ist als bei 5 °C. Am Ende des Versuches liegt die Koloniezahl unter dem Ausgangswert, bleibt aber über $0,7 \cdot 10^2$ KbE/ml.

Tabelle 7: Gemittelter Verlauf des Keimgehaltes im Flusswasser mit Progesteron bei 5 °C und 20 °C sowie Sterilkontrollen der sterilisierten Ansätze

Variante	Ausgangswert (KbE/ml)		Tag 8 (KbE/ml)		Tag 28 (KbE/ml)	
	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar
FW + P4 (5 °C)	$1,7 * 10^3$	$1,9 * 10^3$	$1,9 * 10^3$	$2,5 * 10^3$	$0,7 * 10^2$	$1,6 * 10^2$
FW + P4 (20 °C)	$1,7 * 10^3$	$1,9 * 10^3$	$2,5 * 10^3$	$4,6 * 10^3$	$3,0 * 10^2$	$2,8 * 10^2$
sFW + P4 (5 °C)	steril		steril		steril	
sFW + P4 (20 °C)	steril		steril		steril	
A. bid. + P4 (20 °C)	steril		steril		steril (Tag 16)	

A. bid. = Aqua bidest.

FW = Flusswasser

KbE = Kolonie bildende Einheiten

P4 = Progesteron

sFW = sterilisiertes Flusswasser

St. I-Agar = Standard I-Agar

4.3 Verlaufsuntersuchungen zur Progesteronkonzentration im Flusswasser mit Belebtschlamm (Versuch 2)

Im 2. Versuch wurde der Konzentrationsverlauf von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser sowie in Aqua bidest. mit Zusatz von Belebtschlamm untersucht. Der Versuch 2 war in drei Varianten unterteilt:

- Variante 1: sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und P4, Lagerung bei 5 °C und 20 °C bis zum 28. Tag
- Variante 2: Aqua bidest. mit Belebtschlamm und P4, Lagerung bei 5 °C bis zum 28. Tag
- Variante 3: Aqua bidest. mit Belebtschlamm ohne P4-Zusatz, Lagerung bei 20 °C bis zum 16. Tag

In allen Ansätzen wurde die Keimzahl während des Versuchszeitraumes überprüft.

4.3.1 Berechnung des Konzentrationsverlaufes mit dem EIASTAR-Programm

In der Tabelle 8 werden die Mittelwerte der Progesteronkonzentrationen in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm dargestellt. In die Berechnung wurden alle Messwerte aus den drei Ansätzen einschließlich aller Wiederholungsmessungen jeder Probe einbezogen (siehe Kapitel 9, Tab. 5). Die Berechnung erfolgte mit dem EIASTAR-Programm.

In sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm fällt die mittlere Progesteronkonzentration bei 5 °C und 20 °C von ausgangs 28 pg/10 µl auf ca. 1,7 pg/10 µl ab (Tab. 8). Der Abfall der Progesteronkonzentration verläuft bei 20 °C schneller als bei 5 °C. Bei der Betrachtung der mittleren Ausgangskonzentrationen in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm fällt jedoch auf, dass sie deutlich niedriger sind als die Ausgangskonzentrationen im 1. Versuch (vgl. Tab. 8 mit Tab. 3, 4 und 5). Die Menge an zugegebenem Progesteron zu den Ansätzen ist jedoch jedes Mal gleich.

Tabelle 8: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm bei 5 °C und 20 °C (Var. 1)

Tag	5 °C				20 °C		
	N	\bar{x} (pg/10 µl)	s		N	\bar{x} (pg/10 µl)	s
0	14	28,2343	12,37443		14	28,2343	12,37443
1	14	7,1679	5,96355		14	1,8836	0,93682
2	14	1,8000	0,97908		14	1,5507	1,21555
4	14	1,6786	1,26118		14	1,9436	1,21663
8	14	1,6036	1,06088		14	2,1450	1,38804
16	14	1,6521	1,14430		14	1,6807	1,13475
28	14	1,7521	1,20001		14	1,7307	1,14345

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

In der Tabelle 9 ist der Konzentrationsverlauf von Progesteron in Aqua bidest. mit Belebtschlamm bei 5 °C dargestellt. Der Ausgangswert liegt ebenfalls unter den Ausgangswerten aus dem 1. Versuch, ist aber höher als in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm (Var. 1). Die Progesteronkonzentration fällt von ausgangs 87 pg/10 ml auf 1,3 pg/10 µl ab.

Tabelle 9: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron im Aqua bidest. mit Belebtschlamm (Var. 2) bei 5 °C

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	11	87,9345	46,41059
1	11	13,1345	16,50313
2	11	4,3109	4,25782
4	11	1,7418	1,15125
8	11	1,2309	1,02534
16	11	1,9591	1,23786
28	11	1,3736	1,12570

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Ohne Zusatz von Progesteron zu Aqua bidest. mit Belebtschlamm ergibt die Konzentrationsberechnung mit dem EIASTAR-Programm geringe Progesteronkonzentrationen (Tab. 10). Diese liegen aber außerhalb der definierten Erkennungsgrenze und lassen deshalb keine quantitative Beurteilung zu.

Tabelle 10: Gemittelte Konzentration (EIASTAR-Programm) von Progesteron im Aqua bidest. mit Belebtschlamm ohne Progesteronzusatz bei 5 °C

Tag	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	6	1,9250	0,34772
8	6	3,1900	2,77682
16	6	2,0517	1,09082

N = Anzahl der Messungen

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

4.3.2 Prozentualer Konzentrationsverlauf in Bezug auf den Ausgangswert

Bei der Betrachtung des prozentualen Konzentrationsverlaufes von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser und in Aqua bidest. mit Belebtschlamm (Abb. 6) wird deutlich, dass die Abbaustufe 10 % bei 20 °C schon am 1. Tag erreicht wird, wohingegen die 5 °C-Varianten diese Stufe erst am 2. Tag erreichen. Die niedrigen Ausgangswerte führen bei der prozentualen Berechnung dazu, dass die 10 %-Marke deutlich unter die Nachweisgrenze des Tests fällt. Dies zeigt sich anhand der Tatsache, dass in der prozentualen Darstellung die Verlaufskurven (Abb. 6) zwar die 10 %-Marke unterschreiten, sich jedoch dann nicht weiter der Nulllinie annähern. Betrachtet man die tatsächlichen Messwerte dieser Varianten (Tab. 8 und 9), so pendeln sich die ermittelten Progesteronkonzentrationen ab dem 2. Tag bei allen Varianten zwischen 1 und 2 pg/10 µl ein und sind damit genauso niedrig wie die Endkonzentrationen von Variante 1 des 1. Versuches.

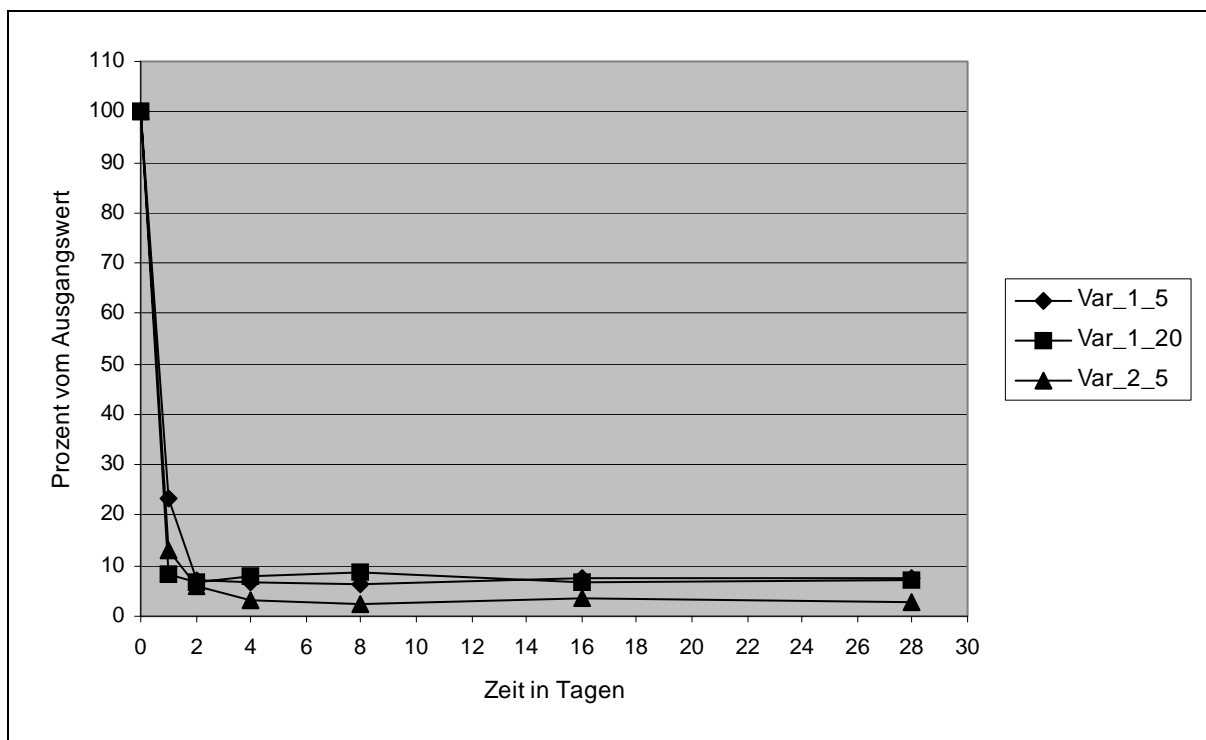


Abbildung 6: Gemittelter prozentualer Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von P4 in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm bei 5 °C und 20 °C (Var. 1) sowie in Aqua bidest. mit Belebtschlamm bei 5 °C (Var. 2)

Var_1_5: sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und P4 bei 5 °C

Var_1_20: sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und P4 bei 20 °C

Var_2: Aqua bidest. mit Belebtschlamm und P4 bei 5 °C

4.3.3 Konzentrationsberechnung mit logistischer Funktion

Für die Abbildung 7 wurde ein typischer Progesteronverlauf in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm ausgewählt. Für diese detaillierte Darstellung wurden lediglich die Wiederholungsmessungen der einzelnen Proben des 3. Ansatzes verwendet. Die Verläufe von Ansatz 1 und 2 sind ähnlich. Die Boxplots beruhen auf nur vier Messwerten. Durch Berechnung der Konzentration mit einer logistischen Funktion ergab sich eine geringere Streuung als bei der Konzentrationsberechnung mit dem EIASTAR-Programm.

Die Abbildung 7 zeigt, dass die Progesteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser bei 20 °C bereits am Tag 1 bis zur Nulllinie abfällt, während die Progesteronkonzentration im Flusswasser bei 5 °C am Tag 1 noch zwischen 10 und 30 pg/10 µl liegt. Am Tag 2 erreicht die 5 °C-Variante dann annähernd das Niveau der 20 °C-Variante.

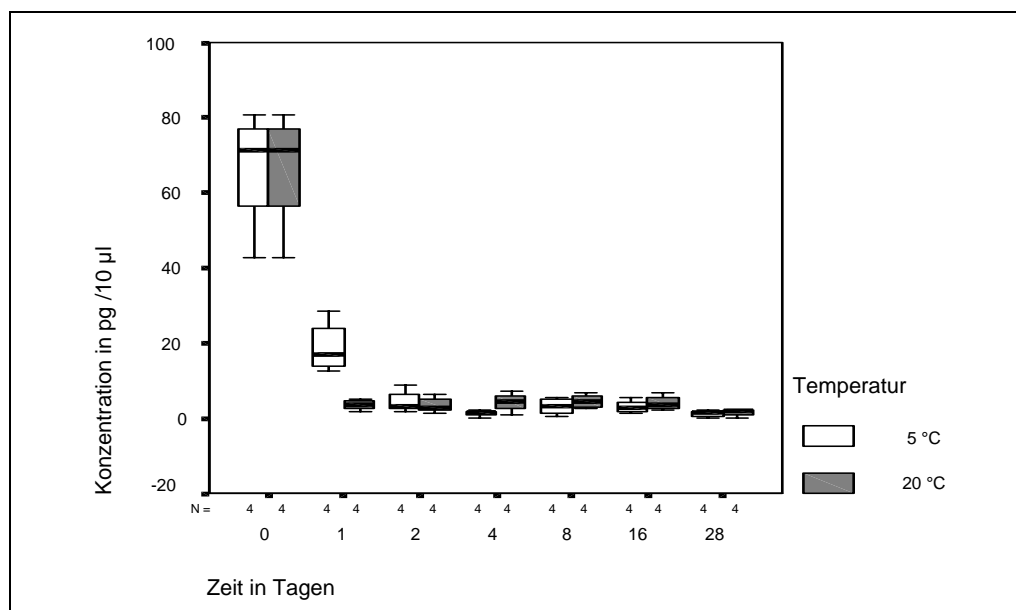


Abbildung 7: Vergleich des Konzentrationsverlaufs (logistische Funktion) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm bei 5 °C und 20 °C (Var. 2)

4.3.4 Vergleich der Konzentrationsverläufe mehrerer Varianten auf einer Platte

Für die weitere Feinanalyse wurde eine ELISA-Platte (Platte C) ausgewählt, auf der die Konzentrationen von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm (bei 5 °C und 20 °C) gleichzeitig mit den Konzentrationen von Progesteron in Aqua bidest. mit Belebtschlamm (bei 5 °C) gemessen wurden (Abb. 8). Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach einer logistischen Funktion. In Abbildung 8 sind die unterschiedlichen Ausgangswerte erkennbar. Die Ausgangskonzentration von Progesteron in Aqua bidest. mit Belebtschlamm liegt bei ca. 140 pg/10 µl, während die Ausgangskonzentrationen von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm nur Werte von ca. 50 pg/10 µl erreichen. Bei der Messung von Werten auf derselben Platte lässt sich ein direkter Vergleich der Konzentrationen herstellen und beurteilen. Die Werte sind Mediane aus drei Messungen. Bei der Darstellung der Messwerte auf einer Platte wird außerdem deutlich, dass die Variante mit niedriger Ausgangskonzentration (Var. 1) einen schnelleren Abfall der Progesteronkonzentration zeigt als die Variante mit höherer Ausgangskonzentration (Var. 2). Zusammenfassend ist zu bemerken, dass durch Zugabe von Belebtschlamm zu sterilisiertem Flusswasser die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme höher ist als in Flusswasser ohne Belebtschlamm (Versuch 1). Bei 20 °C findet ein schnellerer Abfall der Hormonkonzentration statt als bei 5 °C.

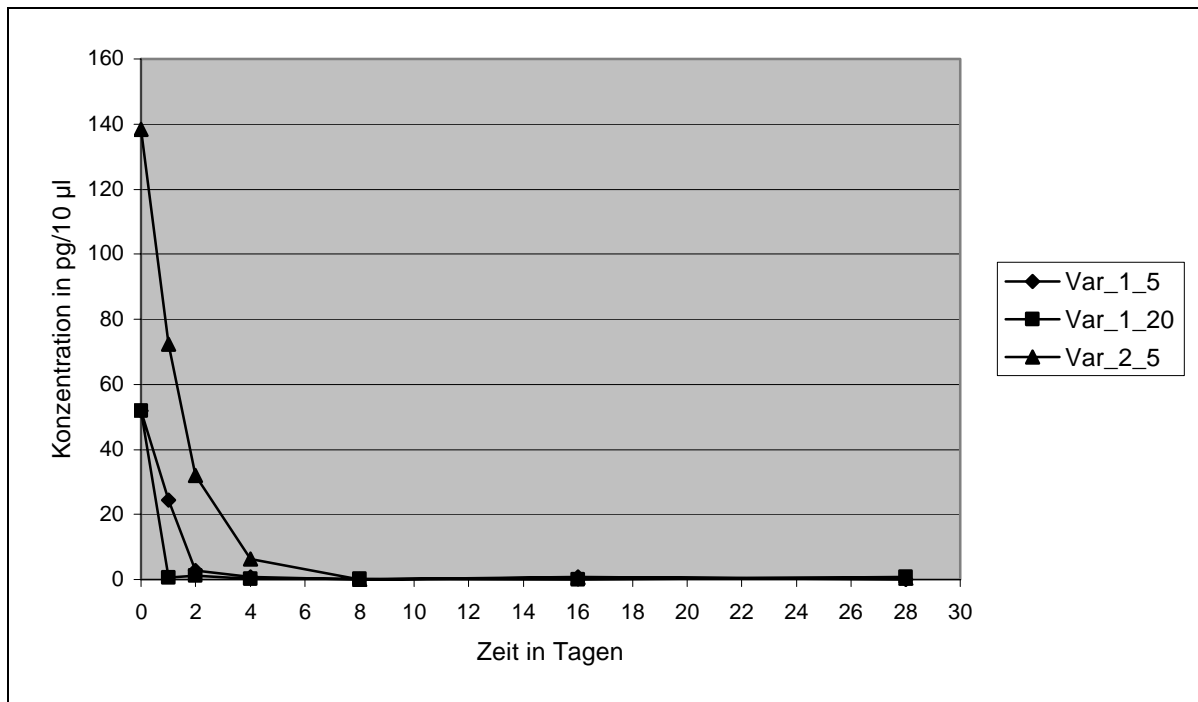


Abbildung 8: Vergleich des Konzentrationsverlaufes (logistische Funktion) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm bei 5 °C und 20 °C sowie in Aqua bidest. mit Belebtschlamm bei 5 °C auf derselben ELISA-Platte (Platte C)

Var_1_5: Sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und Progesteron bei 5 °C

Var_1_20: Sterilisiertes Flusswasser mit Belebtschlamm und Progesteron bei 20 °C

Var_2_5: Aqua bidest. mit Belebtschlamm und Progesteron bei 5 °C

4.3.5 Bakteriologische Untersuchung

Die Bakteriologische Untersuchung diente zum einen der Kontrolle, inwieweit die Verdünnung des Belebtschlammes die angestrebte Koloniezahl erbracht hatte und zum anderen, inwiefern die Lagerung einen Einfluss auf die Entwicklung der Koloniezahl hatte. Es wurden jeweils an den Tagen 0, 8 und 28 Proben zur bakteriologischen Untersuchung entnommen. Es wurden Mittelwerte aus allen Koloniezahlbestimmungen der jeweiligen Varianten in allen drei Ansätzen gebildet (Tab. 11). Die Ausgangskoloniezahl der Belebtschlammvarianten liegt bei etwa 10^3 KBE und entspricht damit der Koloniezahl im Flusswasser (vgl. Tab. 7). In allen Varianten kommt es in der 1. Woche zu einer Zunahme der Kolonien pro ml Wasser. Bei 20 °C Lagerungstemperatur ist das Keimwachstum höher als bei 5 °C.

Tabelle 11: Verlauf des Keimgehaltes in sterilisiertem Flusswasser mit Belebtschlamm und Progesteron bei 5 °C und 20 °C (Var. 1) sowie in Aqua bidest. mit Belebtschlamm und Progesteron bei 5 °C (Var. 2)

Variante	Ausgangswert (KbE/ml)		Tag 8 (KbE/ml)		Tag 28 (KbE/ml)	
	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar
sFW+BS+P4 (5 °C)	$9,3 * 10^3$	$8,5 * 10^3$	$2,4 * 10^4$	$1,2 * 10^4$	$1,3 * 10^3$	$1,2 * 10^3$
sFW+BS+P4 (20 °C)	$9,3 * 10^3$	$8,5 * 10^3$	$1,3 * 10^5$	$2,4 * 10^5$	$1,2 * 10^5$	$8,8 * 10^4$
A. bid.+BS+P4 (5 °C)	$1,5 * 10^4$	$7,8 * 10^3$	$2,4 * 10^5$	$1,5 * 10^5$	$2,8 * 10^4$	$1,2 * 10^4$

A. bid. = Aqua bidest

BS = Belebtschlamm

KbE = Kolonie bildende Einheiten

P4 = Progesteron

sFW = sterilisiertes Flusswasser

St. I-Agar = Standard I-Agar

4.4 Verlaufsuntersuchungen zur Progesteronkonzentration im Flusswasser mit definierten Bakterienspezies (Versuch 3)

Im 3. Versuch wurde geprüft, ob einzelne Keimspezies in der Lage sind, Progesteron im Wasser abzubauen. Aus dem Flusswasser konnten *Aeromonas sobria* (*A. sobria*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert werden. Diese Keime wurden in steriles Flusswasser bzw. physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) gegeben. Nach dem Zusatz von Progesteron wurde der Konzentrationsverlauf über 28 Tage gemessen.

4.4.1 Berechnung des Konzentrationsverlaufes mit dem EIASTAR-Programm

Sowohl bei den Ansätzen mit *A. sobria* als auch mit *E. coli* findet kein Abfall der Progesteronkonzentration statt (Tab. 12 und 13). Die über alle Ansätze und alle Messwiederholungen gemittelten Konzentrationen schwanken um den Ausgangswert, liegen aber bis zum Versuchsende auf nahezu gleichem Niveau.

Während bei den *A. sobria*-Ansätzen die erwartete Ausgangskonzentration von ca. 150 pg/10 µl in den gemittelten Werten annähernd vorliegt (Tab. 12), ist sie bei den *E. coli*-Ansätzen um fast 100 pg/10 µl niedriger und liegt bei 44 bzw. 50 pg/10 µl (Tab. 13). Betrachtet man jedoch die einzelnen Messwerte der durchgeführten Messwiederholungen in den einzelnen Ansätzen (Kapitel 9, Tab. 8-11), so fallen insbesondere die starken Schwankungen der Messwerte der Ansätze mit *A. sobria* auf. Das wird außerdem in der Tabelle 12 bei Betrachtung der Standardabweichung deutlich, die im Vergleich zur Standardabweichung bei den *E. coli*-Ansätzen (Tab. 13) sehr viel höher liegt. Zum Beispiel beträgt die Standardabweichung in den Ausgangswerten der *A. sobria*-Ansätze 109 pg/10 µl bzw. 86 pg/10 µl, während sie in den Ansätzen mit *E. coli* nur 19 pg/10 µl bzw. 17 pg/10 µl beträgt.

Tabelle 12: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser (Var. 1a) und in NaCl-Lösung (Var. 1b) mit *A. sobria* bei 20 °C

Tag	<i>A. sobria</i> in sterilisiertem FW mit P4 bei 20 °C				<i>A. sobria</i> in NaCl-Lsg. mit P4 bei 20 °C		
	N	\bar{x} (pg/10 µl)	s		N	\bar{x} (pg/10 µl)	s
0	11	144,0691	109,91330		8	110,7813	86,91840
1	11	127,1718	107,50411		8	103,2525	99,74985
2	11	113,5464	118,20227		8	81,0150	49,46496
4	11	115,2300	119,58038		8	108,3925	87,46430
8	11	126,8100	118,27068		8	115,4600	109,19455
16	11	161,0536	176,93089		8	100,6788	71,65833
28	11	155,3391	152,80301		8	124,3163	140,84830

A. sobria = *Aeromonas sobria*

FW = Flusswasser

N = Anzahl der Messungen

NaCl-Lsg. = physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lösung)

P4 = Progesteron

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Tabelle 13: Gemittelter Konzentrationsverlauf (EIASTAR-Programm) von Progesteron in sterilisiertem Flusswasser (Var. 2a) und in NaCl-Lösung (Var. 2b) mit *E. coli* bei 20 °C

Tag	<i>E. coli</i> in sterilisiertem FW mit P4 bei 20 °C			<i>E. coli</i> in NaCl-Lsg. mit P4 bei 20 °C		
	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s	N	\bar{x} (pg/10 μ l)	s
0	9	44,2489	19,37118	9	50,6111	17,20949
1	9	47,8889	18,86396	9	51,8122	22,93670
2	9	38,1456	19,80598	9	48,5344	21,81832
4	9	34,9811	9,40666	9	56,5856	31,51410
8	9	36,1944	10,19112	9	48,5800	15,42341
16	9	32,5200	12,07588	9	53,8744	15,66150
28	9	41,0933	19,93384	9	53,8544	36,39072

E. coli = *Escherichia coli*

FW = Flusswasser

N = Anzahl der Messungen

NaCl-Lsg. = physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lösung)

P4 = Progesteron

s = Standardabweichung

\bar{x} = arithmetisches Mittel

4.4.2 Bakteriologische Untersuchung:

Die bakteriologische Untersuchung zeigt, dass die gewünschten Anfangskeimzahlen von 10^6 KbE/ml erreicht wurden. Bei Überprüfung des Verlaufes der Koloniezahlen über den Versuchszeitraum sind Schwankungen zu verzeichnen, sie bleiben jedoch im 10^6 -Bereich. Es wurden Mittelwerte aus allen Koloniezahlbestimmungen der jeweiligen Varianten in allen drei Ansätzen gebildet (Tab. 14).

Tabelle 14: Verlauf des Keimgehaltes in sterilisiertem Flusswasser mit *A. sobria* bzw. *E. coli* und Progesteron sowie in NaCl-Lösung mit *A. sobria* bzw. *E. coli* und Progesteron bei 20 °C

Variante	Ausgangswert (KbE/ml)		Tag 8 (KbE/ml)		Tag 28 (KbE/ml)	
	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar	St. I- Agar	Blut- Agar
sFW + <i>A. sobria</i> + P4	1,4*10 ⁶	1,5*10 ⁶	5,5*10 ⁶	2,2*10 ⁶	2,3*10 ⁶	1,8*10 ⁶
NaCl-Lsg. + <i>A. sobria</i> + P4	2,2*10 ⁶	2,8*10 ⁶	3,2*10 ⁶	4,1*10 ⁶	3,6*10 ⁶	3,2*10 ⁶
sFW + <i>E. coli</i> +P4	4,7*10 ⁶	4,7*10 ⁶	4,0*10 ⁶	3,6*10 ⁶	3,7*10 ⁶	4,4*10 ⁶
NaCl-Lsg. + <i>E. coli</i> + P4	5,6*10 ⁶	4,7*10 ⁶	1,7*10 ⁶	1,1*10 ⁶	1,5*10 ⁶	4,9*10 ⁶

A. bid. = Aqua bidest.

A. sobria = *Aeromonas sobria*

E. coli = *Escherichia coli*

KbE = Kolonie bildende Einheiten

P4 = Progesteron

sFW = sterilisiertes Flusswasser

St. I-Agar = Standard I-Agar

Im Laufe der Versuche konnte keine Verunreinigung durch andere Keime festgestellt werden.