

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung der Versuche

Den Untersuchungen liegt die Hypothese zugrunde, dass Östrogene außerhalb des Organismus mikrobiell-enzymatisch abgebaut werden. Zur Prüfung der Hypothese wurden Verlaufsuntersuchungen zur Konzentration von Östron und 17 β -Östradiol im Wasser mit Mikroorganismen durchgeführt und mit Verlaufsuntersuchungen im sterilisierten Wasser verglichen. Es wurden Vorversuche, Hauptversuche und Ergänzungsversuche durchgeführt.

3.1.1 Vorversuche

Die Vorversuche dienten der Planung der Hauptversuche und waren erforderlich, um zu klären, ob der Enzymimmunoassay geeignet ist, den Konzentrationsverlauf von Östron im Wasser zu verfolgen.

97 ml nicht sterilisiertes Flusswasser, d. h. originäres Flusswasser, wurden mit 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) versetzt. Davon wurde sofort eine Probe von 2 ml für die spätere Bestimmung der Ausgangskonzentration entnommen und in einem Eppendorfgefäß bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Lösung auf zwei Gewindeflaschen aus Duran® (500 ml) verteilt und bei 5 °C bzw. 30 °C in Dunkelheit gelagert. Der Versuch wurde zweimal angesetzt. Im ersten Ansatz wurde die Konzentration von Östron 11 Tage lang verfolgt. Im zweiten Ansatz, mit neu angesetzten Lösungen, wurde der Untersuchungszeitraum verlängert (75 Tage bei 5 °C und 52 Tage bei 30 °C). Während der Lagerung wurden an mehreren Tagen Proben entnommen. Die Proben von 2 ml wurden nach der Entnahme bis zur Untersuchung in Eppendorfgefäßen bei -20 °C eingefroren. Bei der späteren Östronbestimmung wurden von jeder Probe neun Einzelproben untersucht. Der Kontrollansatz enthielt originäres Flusswasser ohne Östronzusatz.

Außerdem sollte die Stabilität von Östron im destillierten Wasser untersucht werden. Es wurde von der Hypothese ausgegangen, dass kein Zerfall von Östron in Aqua bidest. stattfindet und dass die Temperatur keinen Einfluss auf die Östronkonzentration hat. 97 ml Aqua bidest. wurden mit 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) versetzt. Von dieser Lösung wurde zunächst für die Bestimmung des Ausgangswertes eine Probe von 2 ml entnommen und in einem Eppendorfgefäß bei -20 °C bis zur Untersuchung eingefroren. Danach wurde die Lösung auf drei Durchstichflaschen verteilt. Die Lagerung der Durchstichflaschen erfolgte bei 5 °C, 20 °C und 30 °C in Dunkelheit. Bis zur achten Woche wurden sechs weitere Proben von 2 ml entnommen und bei -20 °C bis zur Untersuchung eingefroren. In gleicher Weise wurde der Versuch zweimal angesetzt. Als Kontrollansatz wurden 97 ml Aqua bidest. mit 3 ml Assaypuffer (s. 3.1.4), dem Lösungsmittel für Östron, versetzt und bei 20 °C gelagert. Am Beginn, in der Mitte und am Ende des Untersuchungszeitraums wurde aus

dem Kontrollansatz eine Probe entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert. Die Sterilität der Lösungen wurde regelmäßig kontrolliert.

3.1.2 Hauptversuche

Die Untersuchungen bestanden aus vier Versuchsserien. Die Zielstellungen und Hypothesen der einzelnen Versuchsserien sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Versuchsserien, Zielstellungen und Hypothesen

Versuchs- serie	Zielstellung	Hypothesen
1	Untersuchungen zur Stabilität von Östron im Flusswasser	Mikroorganismen bauen Östron ab. Die Temperatur hat einen Einfluss.
2	Untersuchungen zur Stabilität von Östron im Flusswasser und Aqua bidest. mit einem Belebtschlamminkokulum	Durch den Belebtschlamm wird Östron beschleunigt abgebaut.
3	Untersuchungen zum Einfluss von <i>Escherichia coli</i> (3a), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (3b) bzw. <i>Aeromonas hydrophila</i> (3c) auf die Östronkonzentration im Flusswasser bzw. in einer NaCl-Lösung	Die isolierten Bakterienspezies sind als Reinkulturen nicht in der Lage, Östron abzubauen.
4	Untersuchungen zur Stabilität von Östradiol im Flusswasser	Östradiol wird langsamer als Östron abgebaut.

In den keimhaltigen Lösungen wurde am Beginn, in der Mitte und am Ende der Untersuchung die Koloniezahl bestimmt. In den steril angesetzten Lösungen wurde die Sterilität am Beginn, in der Mitte und am Ende der Untersuchung kontrolliert (s. 3.3.1).

3.1.2.1 Östronkonzentration im Flusswasser (Versuchsserie 1)

Es handelte sich um den wichtigsten Versuch der Untersuchungen. Der Konzentrationsverlauf von Östron wurde im nicht sterilisierten Flusswasser mit dem Konzentrationsverlauf von Östron im sterilisierten Flusswasser verglichen. Das Flusswasser wurde aus der Spree in Berlin mit einer zwei Liter fassenden braunen Glasflasche aus einer Tiefe von ca. 1 m entnommen. Danach wurden folgende zwei Varianten mit Flusswasser hergestellt:

- Variante 1: Es wurden 97 ml Flusswasser verwendet und 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurden 97 ml autoklaviertes Flusswasser verwendet (15 Minuten, 121 °C) und 3 ml Östronstammlösung hinzugefügt.

Der Kontrollansatz enthielt 97 ml Flusswasser und 3 ml Assaypuffer (s. 3.1.4).

Die Varianten 1 und 2 wurden, nachdem jeweils 2 ml für die spätere Bestimmung des Ausgangswertes bei -20 °C eingefroren wurden, auf jeweils drei Gewindeflaschen aus

Duran® (500 ml) verteilt und bei 5 °C, 20 °C bzw. 30 °C in Dunkelheit gelagert. 6 bzw. 11 weitere Probenentnahmen (2 ml) erfolgten bis zum 56. Tag. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren. Der Versuch wurde dreimal mit jeweils frisch entnommenem Flusswasser angesetzt. Aus dem Kontrollansatz wurden am Beginn, in der Mitte und am Ende des Untersuchungszeitraums eine Probe von 2 ml entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

3.1.2.2 Östronkonzentration im Wasser mit einem Belebtschlamminokulum (Versuchsserie 2)

Der Belebtschlamm wurde mit einem Schöpfer aus dem Belebungsbecken eines Klärwerks in Berlin Falkenberg entnommen. Das Klärwerk erhält 80 % häusliche Abwässer und 20 % industrielle Abwässer (Wolfgang, 2001). Der Transport erfolgte in einer Gewindeflasche und nach spätestens einer Stunde wurden folgende vier Lösungen angesetzt:

- Variante 1: Es wurden 96 ml Aqua bidest. verwendet und 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) sowie 1 ml Belebtschlamm hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurden 96 ml Flusswasser verwendet und 3 ml Östronstammlösung sowie 1 ml Belebtschlamm hinzugefügt.
- Variante 3: Es wurden 97 ml Flusswasser verwendet und 3 ml Östronstammlösung hinzugefügt.
- Variante 4: 48,5 ml autoklavierter Belebtschlamm (15 Minuten, 121 °C) wurden mit 48,5 ml Aqua bidest. verdünnt und 3 ml Östronstammlösung hinzugefügt.

Als Kontrollansatz diente eine Lösung mit 96 ml Flusswasser, 3 ml Assaypuffer (s. 3.1.4) und 1 ml Belebtschlamm. Die Varianten wurden nach Entnahme von 2 ml für die Bestimmung des Ausgangswertes bei 20 °C über 56 Tage in Dunkelheit gelagert. Der Ausgangswert und die 11 danach entnommenen Proben wurden bis zur Bestimmung der Östronkonzentration bei -20 °C eingefroren. Die Varianten 1 und 2 wurden dreimal angesetzt. Aus dem Kontrollansatz wurden am Beginn, in der Mitte und am Ende des Untersuchungszeitraums eine Probe von 2 ml entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

3.1.2.3 Östronkonzentration im Wasser mit inokulierten Bakterien (Versuchsserie 3)

Aus dem Flusswasser wurden Bakterien isoliert, mit den API 20 und API 20 NE Systemen identifiziert und in Microbank Röhrchen konserviert (s. 3.1.5). Es handelte sich um *Escherichia coli* (Versuchsserie 3a), *Pseudomonas fluorescens* (Versuchsserie 3b) und *Aeromonas hydrophila* (Versuchsserie 3c).

Zu Versuchsbeginn wurden die Bakterienarten jeweils als Reinkulturen auf Nähragarplatten kultiviert. Aus 0,85 %iger Natriumchloridlösung und den Bakterienkolonien wurden Suspen-

sionen hergestellt, die eine optische Dichte von 0,6 aufwiesen. Die optische Dichte wurde mit dem Photometer Specord 200 von der Carl Zeiss Technology, Analytic Jena gemessen. Aus jeder Bakteriensuspension wurden folgende zwei Varianten hergestellt:

- Variante 1: Es wurden 96 ml autoklaviertes Flusswasser verwendet und 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) sowie 1 ml Bakteriensuspension hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurden 96 ml sterile 0,85 %ige Natriumchloridlösung verwendet und 3 ml Östronstammlösung sowie 1 ml Bakteriensuspension hinzugefügt.

Als Kontrollansatz diente jeweils eine Lösung von 96 ml autoklaviertem Flusswasser, 3 ml Assaypuffer (s. 3.1.4) und 1 ml Bakteriensuspension.

Die Varianten wurden nach der Entnahme von 2 ml für die spätere Bestimmung des Ausgangswertes bei 20 °C über 56 Tage in Dunkelheit gelagert. Die Probe für den Ausgangswert und die sechs danach entnommenen Proben wurden bis zur Bestimmung der Östronkonzentration bei -20 °C eingefroren. Der Versuch wurde für jede Bakterienart dreimal angesetzt. Aus dem Kontrollansatz wurden am Beginn, in der Mitte und am Ende des Untersuchungszeitraums eine Probe von 2 ml entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

3.1.2.4 17 β -Östradiolkonzentration im Flusswasser (Versuchsserie 4)

Es wurden folgende zwei Varianten hergestellt, um den Konzentrationsverlauf von 17 β -Östradiol zu untersuchen:

- Variante 1: Es wurden 97 ml Flusswasser verwendet und 3 ml 17 β -Östradiolstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurden 97 ml autoklaviertes Flusswasser verwendet und 3 ml 17 β -Östradiolstammlösung hinzugefügt.

Der Kontrollansatz enthielt 97 ml nicht sterilisiertes Flusswasser und 3 ml Assaypuffer (s. 3.1.4). Die Varianten wurden bei 20 °C in Dunkelheit über 56 Tage gelagert. 12 Proben wurden während der Lagerung entnommen und bis zur Bestimmung der 17 β -Östradiolkonzentration bei -20 °C eingefroren. Der Versuch wurde dreimal angesetzt. Aus dem Kontrollansatz wurden am Beginn, in der Mitte und am Ende des Untersuchungszeitraums eine Probe von 2 ml entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

3.1.3 Ergänzungsversuche

In den Vor- und Hauptversuchen traten z. T. große Varianzen im Verlauf der Östrogenkonzentration auf. Daher wurden im Ergänzungsversuch alle Proben von einer Verlaufsuntersuchung auf einer Mikrotiterplatte gemeinsam untersucht. Da zwei Kurvenverläufe vergleichbar sein sollten, musste das Plattenbelegungsschema geändert werden (s. 3.2.3). In den Haupt-

versuchen wurden für eine Verlaufsuntersuchung jeweils mehrere Mikrotiterplatten verwendet. Im Ergänzungsversuch wurden folgende zwei Varianten mit Hormonlösungen hergestellt:

- Variante 1: Es wurden 97 ml Flusswasser verwendet und 3 ml Östronstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurden 97 ml Flusswasser verwendet und 3 ml 17 β -Östradiolstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.

Von diesen Varianten wurden die Proben für die spätere Bestimmung der Ausgangswerte (2 ml) entnommen und bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurden beide Varianten auf jeweils zwei Gewindeflaschen aus Duran® (500 ml) verteilt und bei 5 °C bzw. 20 °C gelagert. Die Lagerung dauerte 18 Tage. In dieser Zeit erfolgten jeweils neun weitere Probenentnahmen (2 ml). Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren. Die Probenentnahmen erfolgten zu Beginn der Untersuchung häufiger als in den Hauptversuchen, damit die Abklingkurve genauer mit einer Modellfunktion beschrieben werden kann.

3.1.4 Herstellung der Östrogenstammlösungen und des Assaypuffers

Östron- und 17 β -Östradiolstammlösung

Östron (1,3,5,(10)-estratriene-3-ol-17-one) und 17 β -Östradiol (1,3,5(10)-estratriene-3, 17 β -diol) wurden als Lyophilisate von der Firma Sigma bezogen. 1 mg Östron bzw. 17 β -Östradiol wurden 24 Stunden in 1 ml Methanol gelöst und anschließend soweit in Assaypuffer verdünnt, bis sich eine Konzentration von rechnerisch 5000 ng Östron bzw. 17 β -Östradiol pro 10 ml Assaypuffer ergab. Die so entstandene Östronstammlösung bzw. 17 β -Östradiolstammlösung wurde mit einem Spritzenfilter filtriert (Porengröße 0,2 μ m), um Keimfreiheit zu erlangen.

Durch das Filtrieren ist ein Substanzverlust möglich. Eine Östronlösung mit einer Konzentration von 163,80 pg/10 μ l Wasser wurde mit einem Spritzenfilter filtriert, wodurch sich die Östronkonzentration auf 98,84 pg/10 μ l Wasser verringerte. Nach erneutem Filtrieren verringerte sich die Östronkonzentration weiter bis auf 3,23 pg/10 μ l Wasser.

Beim Sterilisieren durch Autoklavierung erfolgte offensichtlich eine Denaturierung der Lösung, so dass von dieser Methode Abstand genommen wurde.

Assaypuffer

Assaypuffer bestand aus 2,24 g Trishydroxyaminomethan, 17,9 g Natriumchlorid, 1,0 g Rinderserumalbumin und 1,0 ml Tween 80 pro 1000 ml Aqua bidest. Vor der Verwendung wurde er durch einen Spritzenfilter filtriert (Porengröße 1,2 μ m).

3.1.5 Isolierung von Bakterien aus dem Flusswasser

Von dem Flusswasser wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, bevor es auf Standard I Agar und Nähragarplatten I mit einem Zusatz von 5 % Hammelblut ausgespatelt wurde. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C im aeroben bzw. anaeroben Milieu. Nach Subkultivierung einzelner Kolonien erfolgte die Identifizierung mit dem API 20 NE System (gramnegative, Oxidase-positive Stäbchen), API 20 E System (gramnegative, Oxidase-negative Stäbchen) und API 20 A System (anaerobe Bakterien). Die API Systeme wurden von der Firma bioMérieux bezogen. Jedes System enthielt 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Medien bzw. Substrate enthielten. In jedes Röhrchen wurde ein Inokulum der zu untersuchenden Bakterienart pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation des API 20 E Systems und API 20 A Systems bei 37 °C und des API 20 NE Systems bei 30 °C kam es zu Farbreaktionen in den Röhrchen. Die Reaktionen wurden mit Hilfe einer Ablesetabelle protokolliert und die Identifizierung erfolgte mit einem analytischen Profil-Index.

Es konnten folgende Bakterienarten mit den API Systemen aus dem Flusswasser identifiziert werden: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Bacillus spp.*, *Hafnia alvei* und *Klebsiella planticola*. Eine weitere Bakterienart konnte das API System nicht unterscheiden. Es handelt sich um *Pseudomonas alcaligenes* oder *Comamonas testosteroni*.

Zur Konservierung der isolierten Bakterien wurden Mikrobank-Kryoröhrchen von der Firma Mast Diagnostica verwendet. Nachdem sich die Bakterien durch Schwenken des Röhrchens an der Oberfläche der Kugeln gebunden haben, wurde das Kryomedium entnommen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zum Ansetzen einer neuen Bakterienkultur wurde ein Nährboden mit einer der Kugeln beimpft.

3.2 Beschreibung des Enzymimmunoassays zur Östrogenbestimmung

3.2.1 Testkit

Die Östron- bzw. Östradiolkonzentration in den Proben wurde mittels eines kompetitiven Enzymimmunoassays bestimmt. Das Prinzip des kompetitiven Enzymimmunoassays beruhte auf einer Konkurrenzreaktion zwischen einer definierten Menge an markiertem Hormon und einer unbekanntem Menge von freiem Hormon in der Probe. Das Testkit für den Enzymimmunoassay wurde aus dem Institut für Biochemie der Tierärztlichen Universität Wien bezogen und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper: beim Schaf erzeugter Antikörper, der gegen IgG des Kaninchens gerichtet ist (s. 3.2.5)
- AK: beim Kaninchen erzeugter Antikörper, der gegen 17 β -Östradiol gerichtet ist (s. 3.2.5)
- EL: mit Biotin markiertes 17 β -Östradiol (s. 3.2.5)
- Östron als Standardsubstanz (s. 3.2.5)

Nach Angaben des Herstellers bestanden Kreuzreaktionen des Antikörpers gegen 17 β -Östradiol vor allem mit Östron (100 %), aber auch mit 17 α -Östradiol (145 %) und Östriol (14 %). Sofern keine Zugabe von Östronstammlösung ins Flusswasser erfolgte, sind die gemessenen Konzentrationen als Äquivalentwerte bezogen auf die Standardsubstanz Östron anzusehen. Der Variationskoeffizient wurde für die Östrogenbestimmung mit 25,79 % im Interassay (n = 25) und durchschnittlich 20,25 % im Intraassay (n = 9) ermittelt. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,61 +/- 0,12 pg (n = 10).

3.2.2 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Es wurden F 96 Maxisorb Mikrotiterplatten aus Polystyrol von der Firma Nunc (Dänemark) verwendet. Die Löcher der Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten) wurden mit jeweils 250 μ l Schaf-anti-Kaninchen-Antikörpern in Coatingpuffer (s. 3.2.5) beschichtet. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm bedeckt, einem Deckel verschlossen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper in den Löchern an die Polystyroloberfläche binden können. Dann wurden die Mikrotiterplatten abgekippt und jede Vertiefung mit 300 μ l Gegencoatingpuffer (s. 3.2.5) mit Mehrkanalpipetten beschickt. Nach drei Stunden Einwirkzeit des Gegencoatingpuffers waren die freien Räume zwischen den Schaf-anti-Kaninchen-Antikörpern durch Rinderserumalbumin abgeblockt. In dieser Form konnten die Mikrotiterplatten vier Wochen bei 4 °C bzw. ein halbes Jahr bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

Vor der Verwendung wurden die Mikrotiterplatten langsam auf Raumtemperatur erwärmt und viermal mit Tween 20 Waschlösung (s. 3.2.5) gewaschen, indem die Löcher der Mikrotiterplatten mit einem Waschkamm (Nunc-Immonu Wash 12) mit der Waschlösung gefüllt und dann solange auf Zellstoff ausgeklopft wurden, bis keine Rückstände der Waschlösung mehr in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten zu sehen waren.

Es folgte die Beschickung der Kavitäten für die unspezifische Bindung (BU), die maximale mögliche Bindung (B0), die Standardpunkte, die Versuchsproben und die Kontrollprobe (Tabelle 5). Die neun Standardpunkte enthielten jeweils 10 μ l einer Östronstandardlösung mit einer Konzentration von 0,32 pg/10 μ l; 0,82 pg/10 μ l; 2,05 pg/10 μ l; 5,12 pg/10 μ l; 12,8 pg/10 μ l; 32 pg/10 μ l; 80 pg/10 μ l; 200 pg/10 μ l bzw. 500 pg/10 μ l.

Tabelle 5: Beschickung der Mikrotiterplatte

	Assay- puffer [µl]	Östron- standard [µl]	Lösung aus dem Versuch [µl]	Lösung mit bekannter Östron- konzent- ration [µl]	Antikörper gegen Östradiol [µl]	Mit Biotin markiertes Östradiol [µl]
BU	150					100
B0	50				100	100
Standardpunkt 1	40	10			100	100
Standardpunkt 2	40	10			100	100
Standardpunkt 3	40	10			100	100
Standardpunkt 4	40	10			100	100
Standardpunkt 5	40	10			100	100
Standardpunkt 6	40	10			100	100
Standardpunkt 7	40	10			100	100
Standardpunkt 8	40	10			100	100
Standardpunkt 9	40	10			100	100
Versuchsprobe	40		10		100	100
Kontrollprobe	40			10	100	100

BU: Probe zur Bestimmung der unspezifischen Bindung

B0: Probe zur Bestimmung der maximal möglichen Bindung

Standardpunkt: Probe zur Erstellung der Standardkurve

3.2.3 Belegung der Mikrotiterplatten

Vorversuche und Hauptversuche

Die Mikrotiterplatten wurden mit folgenden Proben belegt (Abb. 1):

- Probe zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Doppelbestimmung)
- Probe zur Bestimmung der maximal möglichen Bindung (Doppelbestimmung)
- neun Proben zur Bestimmung der Standardkurve (jeweils als Doppelbestimmung)
- vier verschiedene Versuchsproben (jeweils neun Doppelbestimmungen)
- Kontrollprobe (Doppelbestimmung)

BU	S3	S7	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P4	P4
BU	S3	S7	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P4	P4
B0	S4	S8	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4
B0	S4	S8	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4
S1	S5	S9	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P4
S1	S5	S9	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P4
S2	S6	P1	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	K
S2	S6	P1	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	K

Ein Quadrat entspricht einer Kavität in der Mikrotiterplatte

BU: Probe mit unspezifischer Bindung (Minimalwert)

B0: Probe mit maximaler Bindung (Maximalwert)

S1-S9: 9 Proben zur Bestimmung der Standardkurve

P1-P4: 4 Versuchsproben (jeweils 9 x 2)

K: Kontrollprobe

Abb. 1: Belegungsschema der Mikrotiterplatten in den Vor- und Hauptversuchen

Ergänzungsversuche

In den Ergänzungsversuchen wurden alle Proben dreimal auf die Mikrotiterplatte gebracht (Abb. 2). So konnte der Medianwert berechnet werden. 20 verschiedene Versuchsproben wurden gemeinsam auf einer Mikrotiterplatte untersucht. Das entsprach zwei kompletten Verlaufsuntersuchungen des Ergänzungsversuchs.

BU	S1	S4	S7	S9	P3	P6	P8	P11	P14	P16	P19
BU	S2	S4	S7	P1	P3	P6	P9	P11	P14	P17	P19
BU	S2	S5	S7	P1	P4	P6	P9	P12	P14	P17	P20
B0	S2	S5	S8	P1	P4	P7	P9	P12	P15	P17	P20
B0	S3	S5	S8	P2	P4	P7	P10	P12	P15	P18	P20
B0	S3	S6	S8	P2	P5	P7	P10	P13	P15	P18	K
S1	S3	S6	S9	P2	P5	P8	P10	P13	P16	P18	K
S1	S4	S6	S9	P3	P5	P8	P11	P13	P16	P19	K

Ein Quadrat entspricht einer Kavität in der Mikrotiterplatte

BU: Probe mit unspezifischer Bindung (Minimalwert)

B0: Probe mit maximaler Bindung (Maximalwert)

S1-S9: 9 Proben zur Bestimmung der Standardkurve

P1-P20: 20 Versuchsproben (jeweils 1 x 3)

K: Kontrollprobe

Abb. 2: Belegungsschema der Mikrotiterplatten in den Ergänzungsversuchen

3.2.4 Inkubation, Detektion und Messung

Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte nach der Belegung über 24 Stunden bei 5 °C unter leichtem Schütteln. Das markierte Hormon konkurriert mit dem unmarkierten Hormon der Probe bzw. des Standards um die Bindungsstelle an den Antikörpern gegen 17 β -Östradiol. Die Verteilungshäufigkeit an den Bindungsstellen entspricht den Konzentrations-

verhältnissen in der Lösung (prozentuale Bindung). Der Antikörper gegen 17β -Östradiol wird von den Schaf-anti-Kaninchen-Antikörpern, die sich auf der Polystyroloberfläche in den Löchern der Mikrotiterplatte befanden, gebunden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit und viermaligem Waschen mit Tween 20 Waschlösung wurden 250 μ l Streptavidin-Peroxidasekonjugat (s. 3.2.5) in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert. Zwischen dem Biotin des markierten Hormons und dem Streptavidin-Peroxidasekonjugat entsteht eine fast irreversible Bindung. Nach 45 Minuten Inkubation bei 5 °C auf dem Schüttler wurde die Mikrotiterplatte viermal mit Tween 20 gewaschen. Nach jedem Befüllen mit Waschlösung wurde die Mikrotiterplatte für eine Minute geschüttelt. Anschließend wurden 250 μ l Tetramethylbenzidin-Lösung (s. 3.2.5) als Detektionssystem pro Loch zugefügt. Das Substrat für die Peroxidase wurde in ein blaues, wasserlösliches Produkt umgewandelt. Nach weiteren 45 Minuten Inkubation bei 5 °C auf einem Schüttler wurde die Reaktion durch 2-molare Schwefelsäure gestoppt, wobei das Produkt gelb wurde. Die Farbintensität entsprach der Konzentration des markierten Hormons. Die optische Dichte (OD-Wert) wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer SLT Labinstruments Deutschland GmbH (SN 120598) gemessen. Die Konzentrationen der zu messenden Proben war umgekehrt proportional zu den OD-Werten (prozentuale Bindung).

Für die Erstellung der Standardkurve wurden auf jeder Mikrotiterplatte neun Konzentrationsstufen S1....S9 als Doppelbestimmung gemessen. Darüber hinaus wurden jeweils zwei Werte mit unspezifischer oder minimaler Bindung (BU) und zwei Werte mit maximaler Bindung (B0) erfasst. In den Vor- und Hauptversuchen wurde die Kalibration von der optischen Dichte zur Östrogenkonzentration mit dem Auswertprogramm EIA-Star Version 9.10 für das SLT-Photometer SN 120598 durchgeführt. Von jeder Doppelbestimmung wurde das arithmetische Mittel angegeben. Lagen die OD-Werte einer Probe nicht auf der Standardkurve, wurde die Konzentration als MAX bzw. MIN vom Auswertprogramm angegeben. In den Ergänzungsversuchen erfolgten alle Messungen als Dreifachbestimmungen und die Kalibrationsmethode wurde verändert (s. 4.3.1.3).

3.2.5 Herstellung der Arbeitsverdünnungen und Stammlösungen

Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper

Die Antikörper wurden in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden zunächst über mindestens 20 Minuten in 2,5 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend mit 250 ml Coatingpuffer verdünnt. So ergab sich eine Menge, die für 20 Mikrotiterplatten ausreichend war. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit einer Mehrkanalpipette.

Antikörper gegen 17 β -Östradiol bzw. Östron

Die Antikörper gegen 17 β -Östradiol lagen lyophilisiert in einer Vorverdünnung von 1:100 vor und mussten über mindestens 20 Minuten in 250 μ l Aqua bidest. gelöst werden. Danach wurden sie mit 200 ml Assaypuffer verdünnt, so dass sich eine Arbeitsverdünnung von 1:80000 einstellte. Die Lösung wurde auf 20 Röhrchen zu je 10 ml verteilt und tiefgefroren gelagert. Für eine Mikrotiterplatte war ein Röhrchen ausreichend.

Biotinyliertes 17 β -Östradiol

Das markierte 17 β -Östradiol lag lyophilisiert in einer Vorverdünnung von 1:1000 vor und wurde vor der Verwendung in 50 μ l Methanol über mindestens 20 Minuten gelöst. Dann wurde es in 200 ml Assaypuffer aufgenommen, bis eine Arbeitsverdünnung von 1:4000000 vorlag. Diese Hormonlösung wurde auf 20 Röhrchen zu je 10 ml verteilt und tiefgefroren gelagert. Für eine Mikrotiterplatte war ein Röhrchen ausreichend.

Östron-Standardlösung

Zur Herstellung der Östron-Standardlösung wurde zunächst eine Östronstammlösung mit einer Konzentration von 5000 ng/10 ml Assaypuffer angesetzt (s. 3.1.4). Die Östronstammlösung wurde in 50 μ l Portionen bis zur Verwendung eingefroren.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden 9 Standardpunkte benötigt. Die Konzentrationsstufen für die Standardpunkte wurden wie folgt hergestellt. 50 μ l Östronstammlösung wurde mit 150 μ l Assaypuffer verdünnt (1250 pg/10 μ l). Daraus wurden 100 μ l entnommen und mit 150 μ l Assaypuffer verdünnt. Dieser Schritt wurde neunmal wiederholt, so dass eine Verdünnungsreihe mit 9 Standardpunkten vorlag. Da die Menge für zwei Verdünnungsreihen ausreichend war, konnten 20 Mikrotiterplatten bestückt werden. Die Verdünnungsreihen waren in tiefgefrorenem Zustand 14 Tage lang haltbar.

Coatingpuffer

Der Coatingpuffer bestand aus 1,95 g Natriumcarbonat und 2,93 g Natriumhydrogencarbonat in 1000 ml Aqua bidest. Der pH-Wert wurde mit 1-molarer HCl auf 9,6 eingestellt. Der Coatingpuffer war 14 Tage lang haltbar.

Gegencoatingpuffer

Der Gegencoatingpuffer bestand aus 3,146 g Trishydroxyaminomethan, 23,3 g Natriumchlorid, 13,0 g Rinderserumalbumin (Firma Sigma, A4503), 1,3 g Natriumazid und 1300 ml Aqua bidest. Der pH-Wert wurde mit 1-molarer Salzsäure auf 7,5 eingestellt und die

Lösung mit einem Spritzenfilter filtriert. Der Puffer musste 24 Stunden vor der Verwendung hergestellt werden und war vier Wochen haltbar.

Tween 20-Waschlösung

1 ml Tween 20 wurde mit 2 l Aqua bidest. verdünnt.

Streptavidin-Peroxidasekonjugat

1 µl Streptavidin-Peroxidasekonjugat wurde mit 30 ml Assaypuffer verdünnt.

Tetramethylbenzidin-Lösung

Die Tetramethylbenzidin-Lösung wurde gebrauchsfertig von der Firma Seramun bezogen.

3.3 Versuchsbegleitende Untersuchungen

3.3.1 Zählung der koloniebildenden Einheiten

Während der Versuche wurden von den nicht sterilen Ansätzen mehrfach die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) ermittelt. Dafür wurde jeweils eine Verdünnungsreihe angelegt und von jeder Verdünnungsstufe 0,1 ml auf Standard I Agarplatten und Nähragarplatten I mit einem Zusatz von 5 % Hammelblut überführt. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C über 48 Stunden. Bei den sterilen Ansätzen wurde die Sterilität während des Versuchsablaufs überprüft. Dafür wurden Standard I Platten und Nähragarplatten I mit einem Zusatz von 5 % Hammelblut mit je 0,1 ml beimpft. Die Platten wurden bei 37 °C über 24 Stunden inkubiert. Standard I Agar bestand aus 15 g/l Pepton, 3,0 g/l Hefeextrakt, 6,0 g/l Natriumchlorid, 1 g/l D(+)-Glucose und 12 g/l Agar-Agar.

3.3.2 Chemische Wasseruntersuchung

Das Flusswasser wurde nach der Entnahme chemisch untersucht. Mit den Testkits der Firma Dr. Lange Chemie wurden neben der Temperatur folgende Parameter bestimmt: pH-Wert, PO₄-P, NO₃-N, NO₂-N, CSB und BSB₅ (Tabelle 6).

Tabelle 6: Chemische Untersuchung des Flusswassers (Mittelwerte, n = 3)

Jahr	Jahreszeit	Temp. [C °]	pH-Wert	PO ₄ -P [mg/l]	NO ₃ -N [mg/l]	NO ₂ -N [mg/l]	CSB [mg/l]	BSB ₅ [mg/l]
2001	Herbst	18,7	8,07	1,29	0,84	0,048	44,8	4,16
	Winter	13,9	7,9	0,59	1,64	0,033	23,97	2,96
2002	Frühling	7,3	8,09	0,34	2,21	0,052	19,35	3,04
	Sommer	16,5	7,96	0,49	0,79	0,027	26,75	4,6
	Herbst	20,2	7,77	1,14	0,54	0,02	25,6	4,64
	Winter	10,6	7,72	0,66	1,2	0,024	19,77	2,26

3.4 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Vor- und Hauptversuche erfolgte mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 11.0 für Windows. Zur Darstellung der Ergebnisse dienten Boxplots. Die Ergebnisse der Ergänzungsversuche wurden zunächst ebenfalls mit dem Programm SPSS ausgewertet, wobei die Mittelwerte zur Erstellung von Verlaufskurven dienten. Nachdem die Östrogenkonzentrationen des Ergänzungsversuchs mit einem anderen Verfahren erneut kalibriert wurden (s. 4.3.1.3), erfolgte die Bearbeitung mit dem Programm Statistica Version 6.0 für Windows. So konnte die Anpassung von verschiedenen Funktionstypen an die Daten dargestellt werden.

Im Anhang sind für jeden Probenentnahmetag der Vor- und Hauptversuche neun Konzentrationswerte angegeben (Mittelwerte aus den neun Doppelbestimmungen). Aus diesen neun Konzentrationswerten sind zusätzlich für jeden Probenentnahmetag der Mittelwert und der Medianwert aufgeführt.

Für die Ergänzungsversuche ist im Anhang für jeden Probenentnahmetag ein Konzentrationswert angegeben (Mittelwert aus der Dreifachbestimmung), der durch die Kalibration des Auswertprogramms EIA-Star Version 9.10 gewonnen wurde. Zum Vergleich ist der Konzentrationswert gegenübergestellt (Medianwert aus der Dreifachbestimmung), der durch eine andere Kalibrationsmethode (s. 4.3.1.3) ermittelt wurde.

Die Bezeichnung „Mittelwert“ bezog sich in allen Versuchen auf das arithmetische Mittel.