

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vorversuche**

#### **4.1.1 Prüfung des Versuchsmodells**

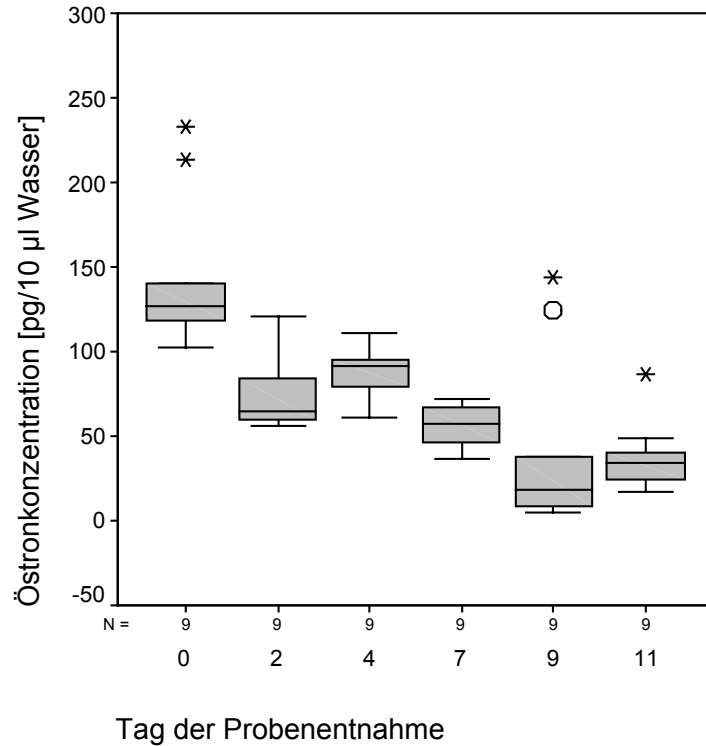
Es wurde getestet, ob der Enzymimmunoassay geeignet ist, Östron wiederzufinden, welches zuvor als Östronstammlösung (s. 3.1.4) in Flusswasser gegeben wurde. Der Konzentrationsverlauf sollte über einen längeren Zeitraum verfolgt werden.

Flusswasser wurde mit Östronstammlösung bei 5 °C bzw. 30 °C gelagert und daraus wiederholt Proben entnommen. Der Versuch wurde zweimal angesetzt. Außerdem wurde überprüft, ob im originären Flusswasser Östrogene nachweisbar sind (Kontrollansatz).

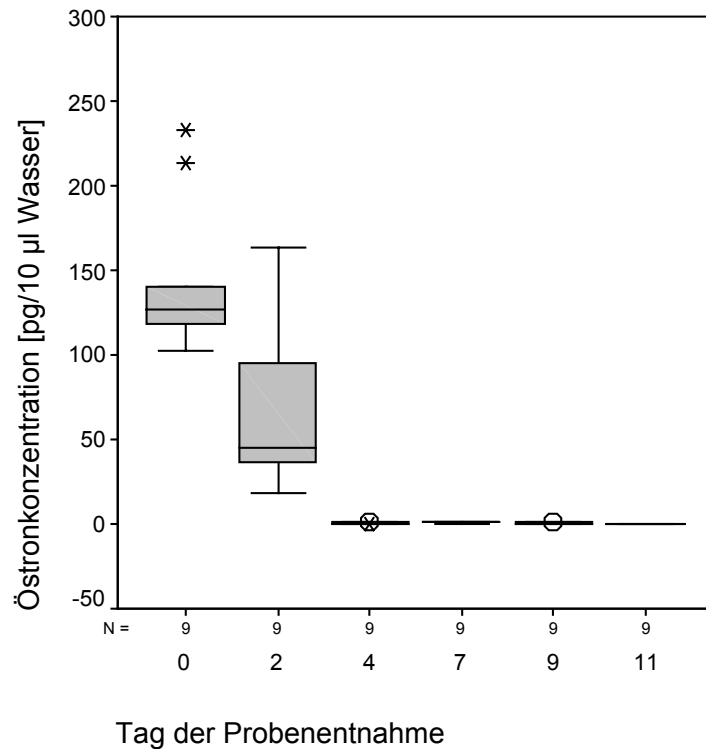
Am Ausgangstag des ersten Versuchsansatzes betrug der Medianwert der Östronkonzentration 126,73 pg/10 µl Wasser. Schon bis zum 2.Tag fiel der Medianwert bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C auf 64,22 pg/10 µl Wasser (ca. 50 % des Ausgangswertes). Am 11. Tag (Ende der Untersuchung) betrug der Medianwert 34,23 pg/10 µl (Abb. 3 und Anhang Tabelle 7). Bei einer Lagerungstemperatur von 30 °C fiel die Östronkonzentration schneller als bei 5 °C. Der Medianwert betrug am 2. Tag 44,81 pg/10 µl Wasser (ca. 35 % des Ausgangswertes) und am 4. Tag unterschritt der Medianwert bereits die untere Nachweisgrenze von 0,61 +/- 0,12 pg/10 µl Wasser (Abb. 4 und Anhang Tabelle 8).

Im zweiten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 241,93 pg/10 µl Wasser. Bis zum 7. Tag fiel er bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C auf 78,80 pg/10 µl (ca. 32 % des Ausgangswertes) und blieb bis zum 31. Tag ungefähr auf diesem Niveau. Am 75. Tag (Ende der Untersuchung) betrug der Medianwert 5,35 pg/10 µl (Anhang Tabelle 9 und Anhang Tabelle 10). Bei einer Lagerungstemperatur von 30 °C sank die Östronkonzentration wieder sehr schnell ab. Schon ab dem 2. Tag unterschritt der Medianwert die untere Nachweisgrenze, nur am 7. Tag wurde sie noch einmal leicht überschritten (Anhang Tabelle 11).

Im Flusswasser ohne Östronzugabe (Kontrollansatz) wurden 0,8 pg/10 µl Wasser Östrogenäquivalente gemessen (Medianwert).



**Abb. 3: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 11 Tage bei 5 °C (1. Versuchsansatz)**



**Abb. 4: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 11 Tage bei 30 °C (1. Versuchsansatz)**

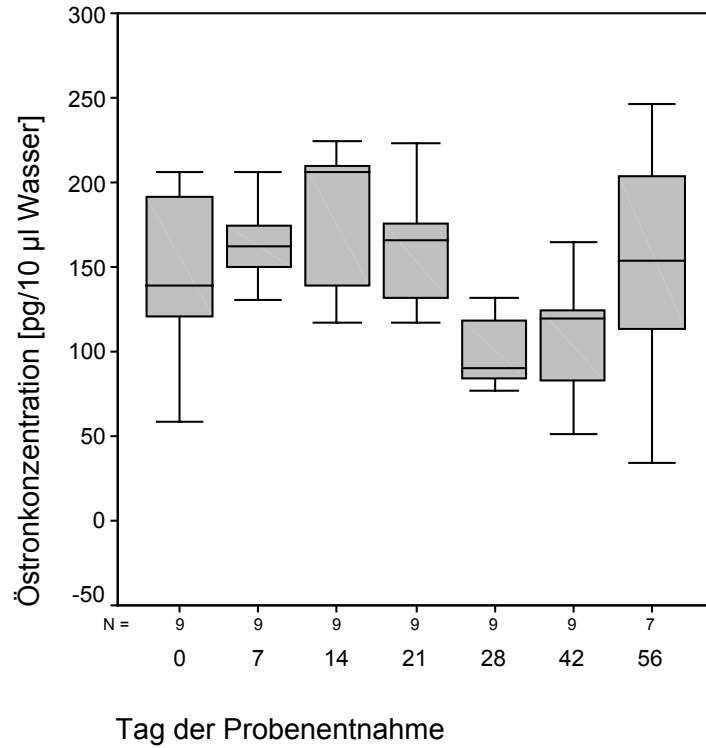
Ausgehend von der Hypothese, dass kein Zerfall von Östron in Aqua bidest. auftritt und die Temperatur keinen Einfluss hat, wurde untersucht, ob Östron unter sterilen Bedingungen in Aqua bidest. während einer Lagerung über 56 Tage stabil bleibt. Östronstammlösung wurde in Aqua bidest. gegeben und bei 5 °C, 20 °C bzw. 30 °C gelagert. Der Versuch wurde zweimal angesetzt. Der Kontrollansatz enthielt keine Östronstammlösung.

Im ersten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 139,57 pg/10 µl Wasser. Während der 56-tägigen Lagerung blieb die Östronkonzentration annähernd auf dem gleichem Niveau (Abb. 5 bis Abb. 7 und Anhang Tabelle 12 bis Anhang Tabelle 14). Am Ende des Untersuchungszeitraums betrug der Medianwert 153,63 pg/10 µl bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C, 153,73 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 20 °C) bzw. 176,54 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 30 °C). Im Verlauf schwankten die Medianwerte bei 5 °C zwischen 90,75 und 206,15 pg/10 µl (Abb. 5), bei 20 °C zwischen 135,81 und 165,09 pg/10 µl (Abb. 6) und bei 30 °C zwischen 137,46 und 176,54 pg/10 µl (Abb. 7).

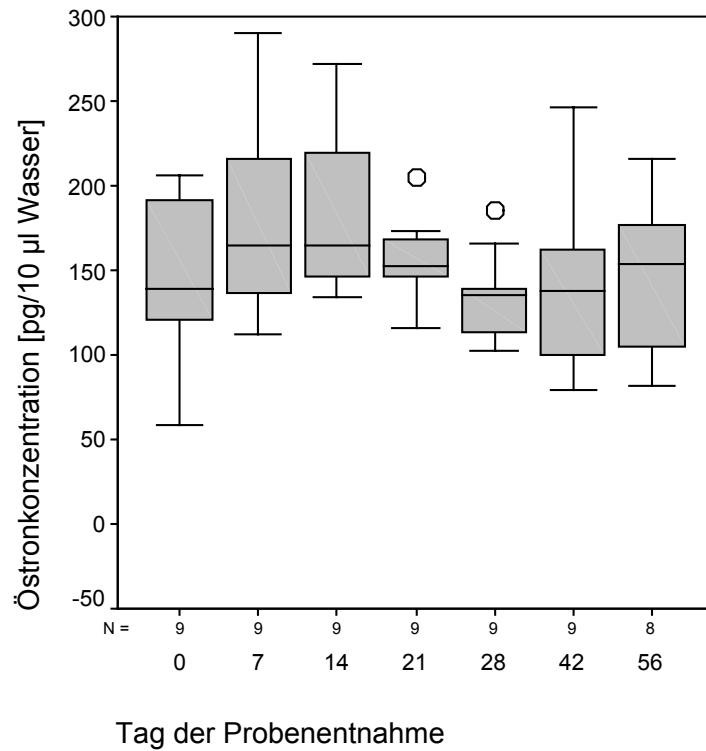
Im zweiten Versuchsansatz blieb die Östronkonzentration über 56 Tage wieder auf einem ähnlichen Niveau (Anhang Tabelle 15 bis Anhang Tabelle 17). Der Medianwert der Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 28,04 pg/10 µl Wasser. Am 56. Tag lagen die Medianwerte bei 19,49 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 5 °C), 19,97 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 20 °C) bzw. 23,18 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 30 °C). Über den Untersuchungszeitraum schwankten die Medianwerte bei 5 °C zwischen 19,49 und 31,48 pg/10 µl Wasser, bei 20 °C zwischen 15,18 und 40,31 pg/10 µl und bei 30 °C zwischen 17,58 und 34,69 pg/10 µl.

Im Kontrollansatz konnte kein Östron nachgewiesen werden.

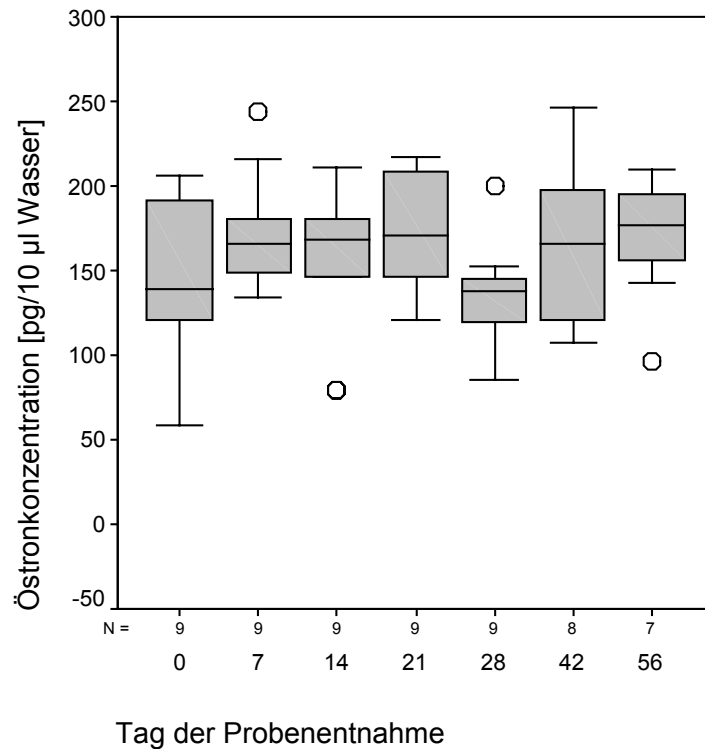
Die Sterilität wurde bei allen Ansätzen zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Lagerung überprüft. Sie blieb während der Lagerung erhalten.



**Abb. 5:** Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. während einer Lagerung über 56 Tage bei 5 °C (1. Versuchsansatz)



**Abb. 6:** Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (1. Versuchsansatz)



**Abb. 7: Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. während einer Lagerung über 56 Tage bei 30 °C (1. Versuchsansatz)**

#### 4.1.2 Schlussfolgerungen für die Versuchsdurchführung

Der Enzymimmunoassay ist geeignet, Östron wiederzufinden, welches zuvor dem Flusswasser zugefügt wurde. Die Konzentrationsabnahme von Östron konnte mit dem Enzymimmunoassay beobachtet werden. Der Einfluss durch die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen wurde deutlich. Im Kontrollansatz wurden 0,8 pg/10 µl Wasser Östrogenäquivalente gemessen, d. h. auch in den folgenden Untersuchungen ist eine geringe Menge Östronäquivalent im Flusswasser zu erwarten.

Im Aqua bidest. blieb die Östronkonzentration dagegen bis zum Ende der Untersuchung am 56. Tag auf einem ähnlichen Niveau. Zwischen den Messtagen war eine Schwankung der Östronkonzentration zu beobachten.

## 4.2 Hauptversuche

Der Hauptversuch gliederte sich in vier Versuchsserien, die jeweils 56 Tage dauerten. Der Konzentrationsverlauf von Östron und auch von 17 $\beta$ -Östradiol wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

### 4.2.1 Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser (Versuchsserie 1)

In der ersten Versuchsserie wurde der Konzentrationsverlauf von Östron im Flusswasser untersucht. Es sollte überprüft werden, ob Mikroorganismen, die natürlicherweise im Flusswasser vorhanden sind, in der Lage sind, Östron abzubauen (Biodegradation). Ein Abbau im sterilisierten Flusswasser dürfte nicht stattfinden. Es wurden zwei Varianten hergestellt:

- Variante 1: Es wurde Flusswasser verwendet und Östronstammlösung hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurde sterilisiertes Flusswasser verwendet und Östronstammlösung hinzugefügt.

Die Lagerung erfolgte bei 5 °C, 20 °C bzw. 30 °C. Der Versuch wurde dreimal angesetzt. Für die Beschreibung des Konzentrationsverlaufs wurden die Medianwerte verwendet.

#### 4.2.1.1 Verlauf der Östronkonzentration im nicht sterilisierten Flusswasser

Im ersten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 119,21 pg/10  $\mu$ l Wasser. Während der Lagerung bei 5 °C (Abb. 8 und Anhang Tabelle 18) sank der Medianwert zunächst leicht auf 116,80 pg/10  $\mu$ l am 7. Tag (ca. 97 % des Ausgangswertes) und dann allmählich bis zum 28. Tag auf 93,01 pg/10  $\mu$ l. Danach sank der Medianwert stark bis zur unteren Nachweisgrenze am 56. Tag. Bei der Lagerungstemperatur 20 °C (Abb. 9 und Anhang Tabelle 19) sank der Medianwert der Östronkonzentration bis zum 7. Tag leicht unter den Ausgangswert von 119,21 pg/10  $\mu$ l auf 104,08 pg/10  $\mu$ l (ca. 87 % des Ausgangswertes) und danach sehr schnell bis zum 14. Tag auf 1,25 pg/10  $\mu$ l. Ab dem 21. Tag bis zum Ende der Untersuchung wurde die untere Nachweisgrenze von 0,61 +/- 0,12 pg/10  $\mu$ l Wasser (s. 3.2.1) unterschritten. Bei der höchsten Temperaturstufe mit 30 °C (Abb. 10 und Anhang Tabelle 20) sank der Medianwert der Östronkonzentration noch schneller. Am 7. Tag war er auf 89,87 pg/10 ml Wasser gesunken (ca. 74 % des Ausgangswertes) und schon ab dem 14. Tag wurde die untere Nachweisgrenze unterschritten.

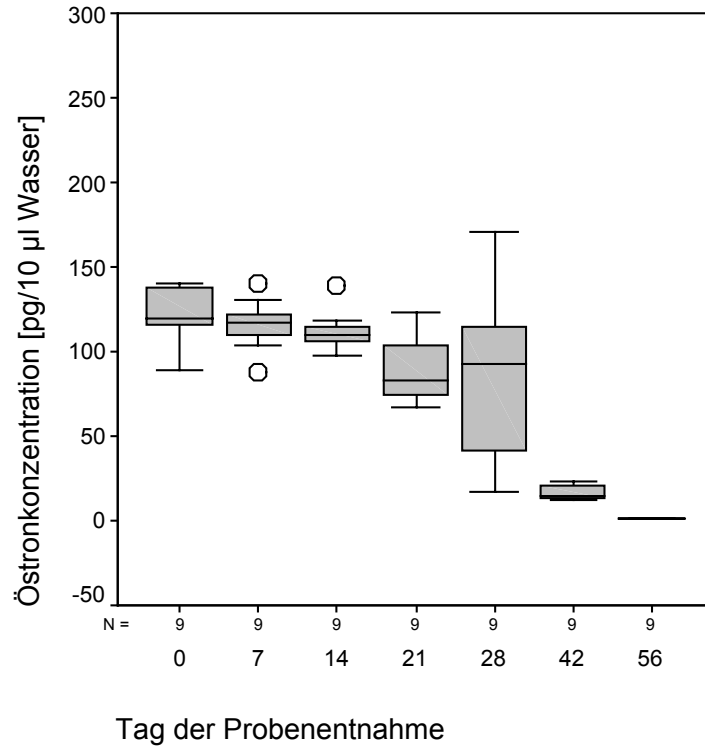
Im zweiten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 184,19 pg/10  $\mu$ l Wasser. Bis zum 6. Tag fiel die Östronkonzentration bei einer Lagerung von 5 °C auf 88,9 pg/10  $\mu$ l (ca. 48 % des Ausgangswertes). Ab dem 28. Tag wurde die untere Nachweisgrenze unterschritten (Anhang Tabelle 21). Bei einer Lagerung von 20 °C fiel die Östronkonzentration bis zum 6. Tag auf 106,17 pg/10  $\mu$ l (ca. 57 % des

Ausgangswertes). Die untere Nachweisgrenze wurde schneller als bei 5 °C erreicht. Sie wurde schon ab dem 10. Tag unterschritten (Anhang Tabelle 22). Bei der höchsten Temperaturstufe (30 °C) war der Medianwert schon am 2. Tag auf 1,72 pg/10 µl gefallen. Ab dem 4. Tag und bei den folgenden Messungen unterschritt die Östronkonzentration die Nachweisgrenze (Anhang Tabelle 23).

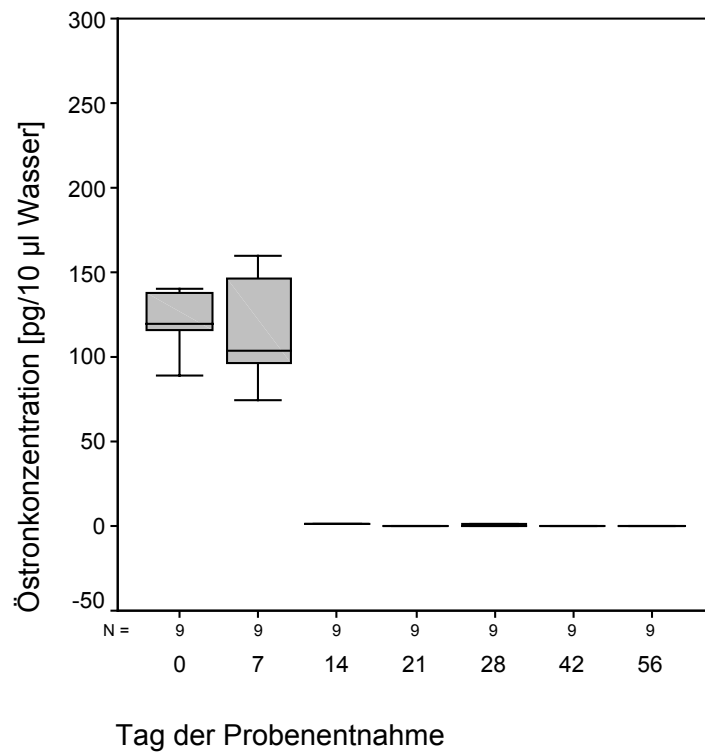
Der dritte Versuchsansatz wurde nur bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C durchgeführt. Der Medianwert der Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 301,45 pg/10 µl Wasser. Die Östronkonzentration fiel zunächst auf 232,43 pg/10 µl am 2. Tag, auf 158,14 pg/10 µl am 4. Tag und auf 2,14 pg/10 µl am 6. Tag (ca. 1 % des Ausgangswertes). Ab dem 10. Tag unterschritten die Medianwerte der Östronkonzentrationen die Nachweisgrenze (Anhang Tabelle 25).

Im Flusswasser ohne Östronzugabe wurden 0,7 pg/10 µl Wasser Östronäquivalente nachgewiesen (Kontrollansatz). Während der Lagerung (20 °C) fiel die Konzentration der Östronäquivalente im Kontrollansatz bis zum 7. Tag unter die Nachweisgrenze.

Die Koloniezahl betrug bei den Ansätzen mit Östronzugabe am Ausgangstag  $10^3$  bis  $10^5$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag vergrößerte sie sich bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C um maximal eine Zehnerpotenz bzw. verkleinerte sich bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C und 30 °C um maximal drei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 1).

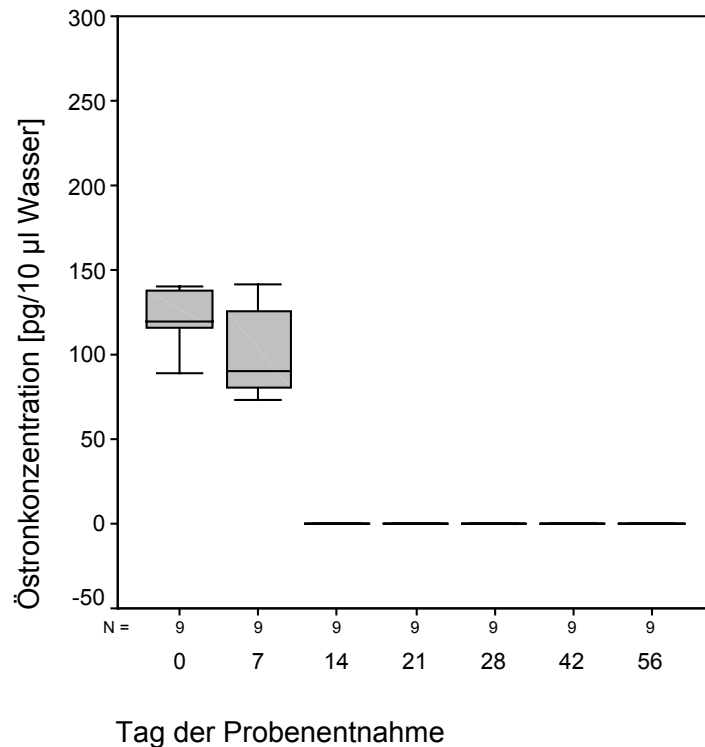


**Abb. 8: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 5 °C (1. Versuchsansatz)**



**Abb. 9: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (1. Versuchsansatz)**





**Abb. 10: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 30 °C (1. Versuchsansatz)**

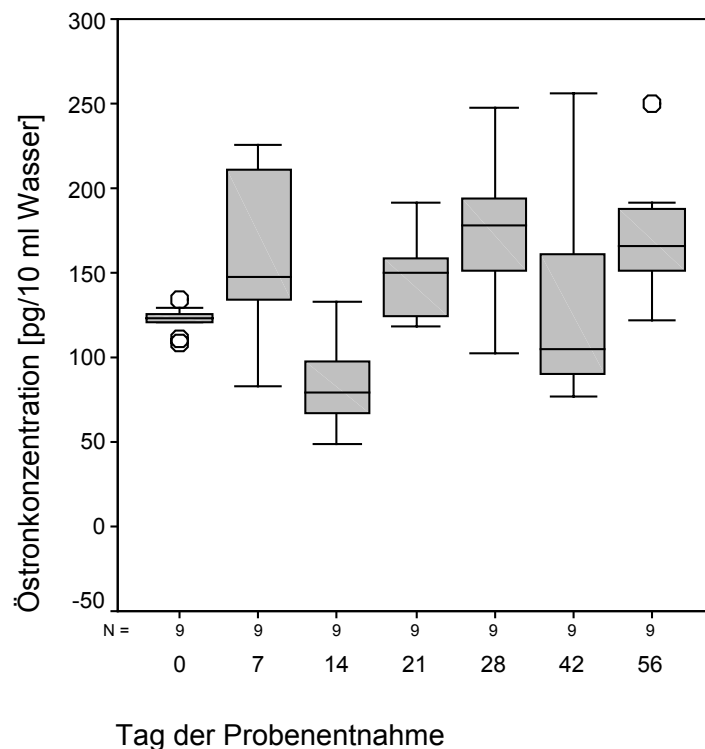
#### 4.2.1.2 Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser

Im ersten Versuchsansatz blieben die Medianwerte der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser annähernd auf gleichem Niveau. Der Medianwert betrug am Ausgangstag 123,31 pg/10 µl Wasser. Am 56. Tag betrug der Medianwert 166,12 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 5 °C), 144,55 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 20 °C) bzw. 179,21 pg/10 µl Wasser (Lagerungstemperatur 30 °C). Die Medianwerte schwankten bei 5 °C zwischen 78,96 und 178,36 pg/10 µl (Abb. 11 und Anhang Tabelle 25), bei 20 °C zwischen 113,16 und 150,68 pg/10 µl (Abb. 12 und Anhang Tabelle 26) und bei 30 °C zwischen 104,83 und 191,67 pg/10 µl (Abb. 13 und Anhang Tabelle 27).

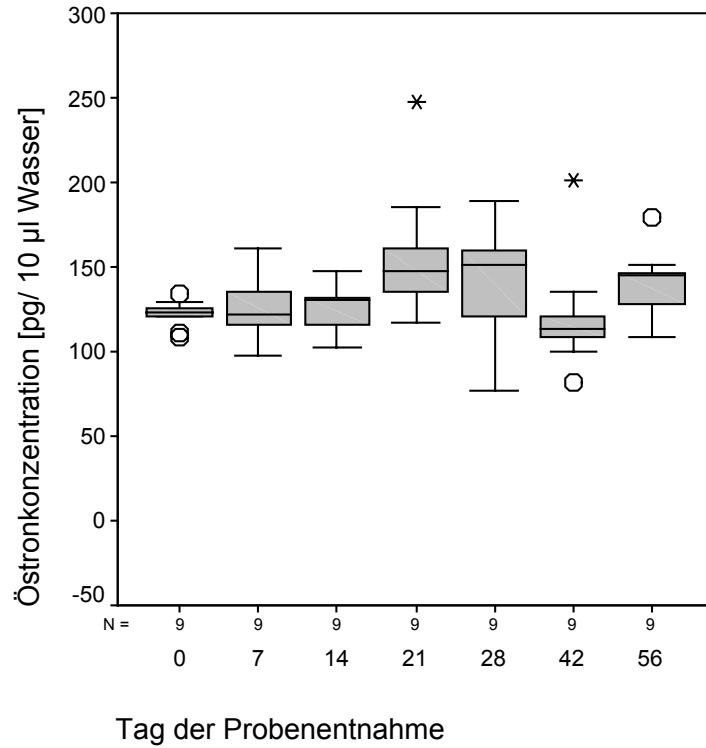
Im zweiten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration zu Beginn der Lagerung 40,81 pg/10 µl. Die Medianwerte waren am Ende der Untersuchung mit 40,52 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 5 °C), 53,32 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 20 °C) bzw. 48,74 pg/10 µl (Lagerungstemperatur 30 °C) ähnlich. Während der Lagerung schwankten die Medianwerte bei 5 °C zwischen 26,19 und 40,81 pg/10 µl (Anhang Tabelle 28), bei 20 °C zwischen 25,01 und 53,32 pg/10 µl (Anhang Tabelle 29) und bei 30 °C zwischen 26,95 und 48,74 pg/10 µl (Anhang Tabelle 30).

Im dritten Versuchsansatz schwankten die Medianwerte der Östronkonzentrationen während einer Lagerung von 20 °C sehr. Am Ausgangstag betrug der Medianwert 320,12 pg/10 µl, in der Mitte der Untersuchung (28. Tag) 332,67 pg/10 µl und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 90,52 pg/10 µl Wasser (Anhang Tabelle 31, Anhang Tabelle 32).

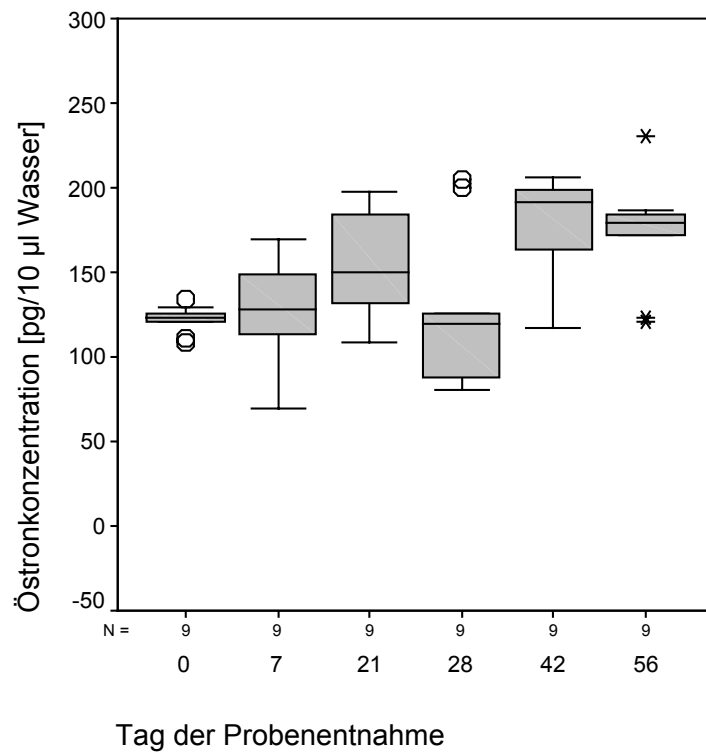
Die Sterilität der drei Versuchsansätze wurde am Beginn, in der Mitte und am Ende der Untersuchung bei allen Temperaturstufen überprüft. Die Ansätze blieben während des Untersuchungszeitraums steril.



**Abb. 11: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 5 °C (1. Versuchsansatz)**



**Abb. 12: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (1. Versuchsansatz)**



**Abb. 13: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 30 °C (1. Versuchsansatz)**

#### **4.2.1.3 Wertung der Ergebnisse von Versuchsserie 1**

Im nicht sterilisierten Flusswasser fiel die Östronkonzentration bei allen Temperaturstufen deutlich ab. Je höher die Lagerungstemperatur war, desto schneller erfolgte der Abfall. Bei 5 °C dauerte es 42 Tage bzw. 21 Tage, bis über 90 % der vorhandenen Östronkonzentration abgebaut war. Bei 20 °C und 30 °C waren 90 % dagegen schon nach 2 bis 14 Tage abgebaut.

Im sterilisierten Flusswasser blieb die Östronkonzentration bis zum Ende der Untersuchungen (56. Tag) auf einem ähnlichen Niveau. Die Temperatur hatte keinen Einfluss.

#### **4.2.2 Einfluss von Belebtschlamm auf den Verlauf der Östronkonzentration im Wasser (Versuchsserie 2)**

In der zweiten Versuchsserie wurde der Verlauf der Östronkonzentration im Wasser unter Zusatz von Belebtschlamm bei 20 °C untersucht. Es war anzunehmen, dass die Mikroorganismen des Belebtschlammes Östron beschleunigt abbauen.

Es wurden vier Varianten untersucht. Die Varianten 1 und 2 wurden dreimal angesetzt, die Varianten 3 und 4 nur einmal.

- Variante 1: Es wurde Aqua bidest. verwendet und ein Belebtschlamminokulum sowie Östronstammlösung hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurde Flusswasser verwendet und ein Belebtschlamminokulum sowie Östronstammlösung hinzugefügt. Im Vergleich zur Variante 1 konnten in der Variante 2 zusätzlich die Mikroorganismen und Substanzen aus dem Flusswasser das Östron beeinflussen.
- Variante 3: Es wurde Flusswasser ohne Belebtschlamminokulum verwendet und Östronstammlösung hinzugefügt. Das Flusswasser stammte aus der selben Charge wie in der zweiten Variante.
- Variante 4: Es wurde sterilisierter Belebtschlamm mit Aqua bidest. verdünnt und Östronstammlösung hinzugefügt.

##### **4.2.2.1 Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. mit einem Belebtschlamminokulum**

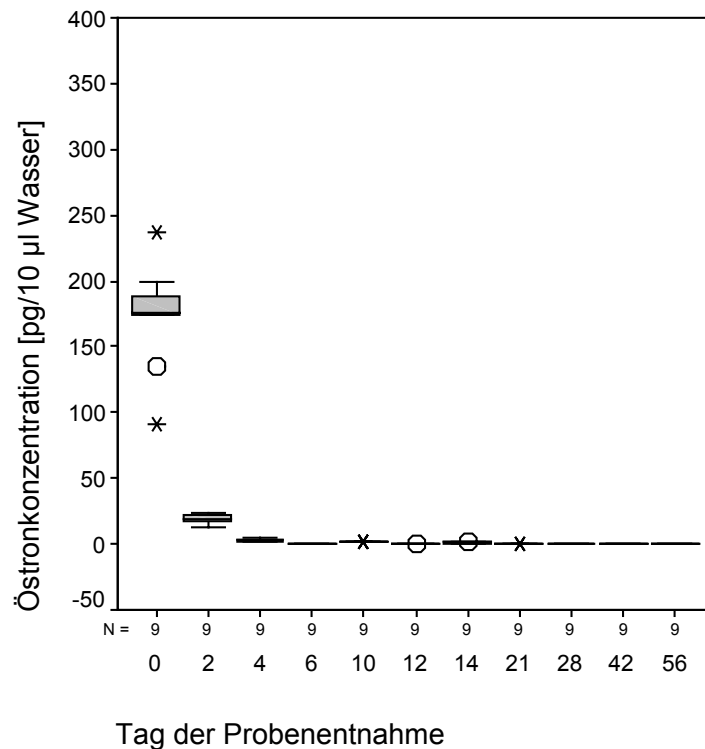
Im ersten Versuchsansatz verringerte sich der Medianwert der Östronkonzentration von 175,60 pg/10 µl Wasser am Ausgangstag auf 18,24 pg/10 µl am 2. Tag (ca. 10 % des Ausgangswertes), 2,87 pg/10 µl am 4. Tag und 1,50 pg/10 µl am 10. Tag. Ab dem 21. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten (Abb. 14 und Anhang Tabelle 33).

Im zweiten Versuchsansatz lag der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag bei 31,32 pg/10 µl Wasser. Bis zum 2. Tag sank der Medianwert auf 25,10 pg/10 µl (ca. 80 % des Ausgangswertes). Erst ab dem 6. Tag fiel die Östronkonzentration stärker, sie

erreichte einen Medianwert von 4,13 pg/10 µl. Bis zum Ende der Untersuchung sanken die Medianwerte bis zur unteren Nachweisgrenze (Anhang Tabelle 34, Anhang Tabelle 35).

Im dritten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 38,45 pg/10 µl Wasser, am 2. Tag 27,21 pg/10 µl (ca. 71 % des Ausgangswertes) und am 4. Tag 55,92 pg/10 µl. Anschließend wurde bis zum Ende der Untersuchung die Nachweisgrenze unterschritten (Anhang Tabelle 36).

Die Koloniezahl betrug am Ausgangstag  $10^4$  bis  $10^5$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag fiel sie bei allen Ansätzen um maximal zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 2).



**Abb. 14: Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. mit einem Belebtschlamminkulum während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (1. Versuchsansatz)**

#### 4.2.2.2 Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser mit einem Belebtschlamminkulum

Wurde statt Aqua bidest. Flusswasser mit einem Belebtschlamminkulum verwendet, sanken die Medianwerte der Östronkonzentration etwas schneller ab.

Im ersten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 153,67 pg/10 µl Wasser, am 2. Tag fiel er auf 30,23 pg/10 µl (ca. 20 % des Ausgangs-

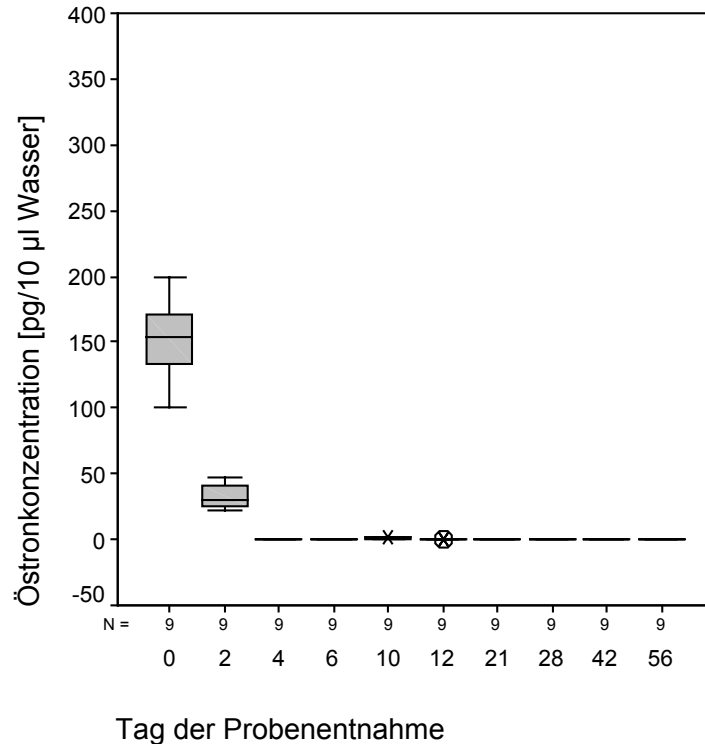
wertes) und ab dem 4. Tag lag er nur leicht über der Nachweisgrenze. Ab dem 12. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten (Abb. 15 und Anhang Tabelle 37).

Im zweiten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 27,08 pg/10 µl Wasser. Am 2. Tag lag der Medianwert mit 33,83 pg/10 µl etwas höher (25 % höher als der Ausgangswert) und bis zum 4. Tag sank er auf 2,63 pg/10 µl (ca. 10 % des Ausgangswertes). Der Medianwert unterschritt danach bis zum 56. Tag größtenteils die untere Nachweisgrenze (Anhang Tabelle 38).

Im dritten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 34,86 pg/10 µl Wasser. Am 2. Tag war er auf 20,53 pg/10 µl gesunken (ca. 58 % des Ausgangswertes) und ab dem 4. Tag wurde die Nachweisgrenze größtenteils unterschritten (Anhang Tabelle 39).

Der Kontrollansatz enthielt nicht sterilisiertes Flusswasser, ein Belebtschlammkolum und Assaypuffer. Es wurden am Beginn 0,5 pg Östronäquivalente pro 10 µl Wasser gemessen. Nach einer Lagerung von 28 Tagen waren diese nicht mehr nachweisbar.

Die Koloniezahl betrug bei den Ansätzen mit Östronzugabe am Ausgangstag  $10^4$  bis  $10^5$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag verringert sich die Koloniezahl bei allen Ansätzen um maximal zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 2).

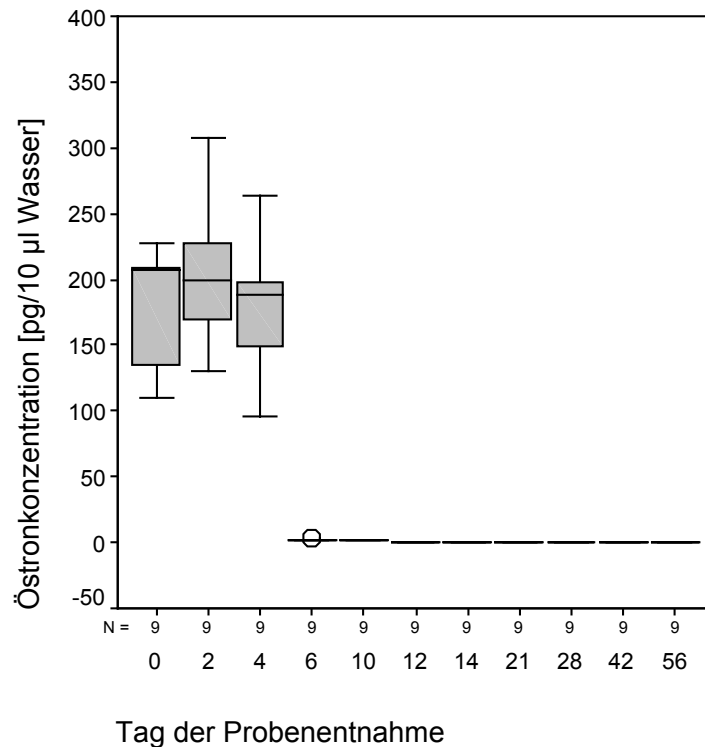


**Abb. 15: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser mit einem Belebtschlamm-inokulum während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (1. Versuchsansatz)**

#### 4.2.2.3 Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser ohne Belebtschlamm-inokulum

Wurde nur Flusswasser ohne Belebtschlamm-inokulum verwendet, fiel die Östronkonzentration zu Beginn langsam (Abb. 16 und Anhang Tabelle 40). Der Medianwert betrug am Ausgangstag 206,46 pg/10 µl Wasser, am 2. Tag 199,15 pg/10 µl (ca. 96 % des Ausgangswertes) und am 4. Tag 188,30 pg/10 µl. Anschließend fiel der Medianwert schnell, am 6. Tag betrug er 2,33 pg/10 µl und am 10. Tag 1,47 pg/10 µl. Ab dem 12. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten.

Die Koloniezahl verringerte sich von  $10^5$  KbE/ml nach 56 Tagen um zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 2).



**Abb. 16: Verlauf der Östronkonzentration ohne Belebtschlamminokulum im Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C**

#### 4.2.2.4 Verlauf der Östronkonzentration im Aqua bidest. mit einem sterilisierten Belebtschlamminokulum

Es wurde nur ein Versuchsansatz hergestellt. Der Belebtschlamm wurde vor der Verwendung autoklaviert. Die Östronkonzentration blieb während der Lagerung annähernd auf dem gleichen Niveau (Anhang Tabelle 41). Der Mittelwert der Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 34,71 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung (28. Tag) 28,17 pg/10 µl Wasser.

Die Sterilität wurde am Beginn, in der Mitte und am Ende der Untersuchung kontrolliert. Sie blieb während des Untersuchungszeitraums erhalten.

#### 4.2.2.5 Wertung der Ergebnisse von Versuchsserie 2

Ein Zusatz von Belebtschlamm in Aqua bidest. bzw. in Flusswasser bewirkte einen etwas schnelleren Abbau von Östron als im Flusswasser ohne Belebtschlammzusatz. Die Östronkonzentration fiel im Aqua bidest. mit einem Belebtschlamminokulum langsamer (90 % Abbau in 4 bis 8 Tagen) als im Flusswasser mit einem Belebtschlamminokulum (90 % Abbau in 4 Tagen) ab. Eine Reduktion der Östronkonzentration fand mit einem sterilisierten Belebtschlamminokulum nicht statt.



### 4.2.3 Verlauf der Östronkonzentration im Wasser mit einer Bakteriensuspension (Versuchsserie 3a, b, c)

Drei aus dem Flusswasser isolierte Bakterienspezies wurden jeweils auf ihre Abbaufähigkeit für Östron bei 20 °C getestet: (a) *Escherichia coli*, (b) *Pseudomonas fluorescens* und (c) *Aeromonas hydrophila*.

Es wurde angenommen, dass keine der isolierten Bakterienspezies unter den gegebenen Bedingungen in der Lage ist, Östron abzubauen, weder wenn neben Östron noch andere Nährstoffe vorhanden sind (im sterilisierten Flusswasser, Variante 1) noch wenn Östron die einzige Nährstoffquelle darstellt (in Natriumchlorid-Lösung, Variante 2).

#### 4.2.3.1 Einfluss von *Escherichia coli* auf den Verlauf der Östronkonzentration im Wasser (Versuchsserie 3a)

In der Versuchsserie 3a wurde eine *Escherichia coli*-Suspension (s. 3.1.2.3) in sterilisiertes Flusswasser bzw. in Natriumchlorid-Lösung gegeben und mit Östronstammlösung (s. 3.1.4) versetzt. Der Versuch wurde dreimal angesetzt.

##### 4.2.3.1.1 Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit *Escherichia coli*

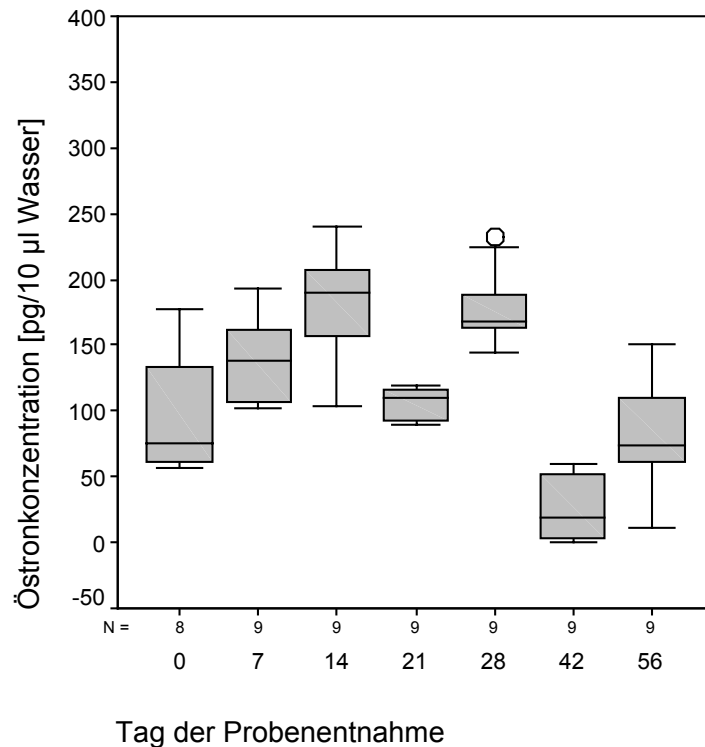
Im ersten Versuchsansatz waren die Medianwerte der Östronkonzentration am Beginn und am Ende der Untersuchung (56. Tag) mit 75,33 bzw. 74,47 pg/10 µl Wasser sehr ähnlich. Während des Untersuchungszeitraumes schwankte die Östronkonzentration sehr stark (Abb. 17 und Anhang Tabelle 42).

Im zweiten Versuchsansatz lag der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag bei 205,33 pg/10 µl Wasser und am 56. Tag bei 71,66 pg/10 µl. Diese Werte waren gleichzeitig die Extremwerte in der Schwankungsbreite der Östronkonzentrationen während des Untersuchungszeitraums (Anhang Tabelle 43).

Im dritten Versuchsansatz lag der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag bei 111,28 pg/10 µl Wasser und am 56. Tag bei 225,18 pg/10 µl. Diese Werte waren wieder die Extremwerte in der Schwankungsbreite der Östronkonzentrationen (Anhang Tabelle 44).

Der Kontrollansatz enthielt sterilisiertes Flusswasser, *Escherichia coli*-Suspension und Assaypuffer. Die Nachweisgrenze wurde nicht überschritten.

Die Koloniezahl betrug in den Ansätzen mit Östronzugabe am Ausgangstag  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag vergrößert bzw. verringert sie sich um maximal eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 3).



**Abb. 17: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit einer *Escherichia coli*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

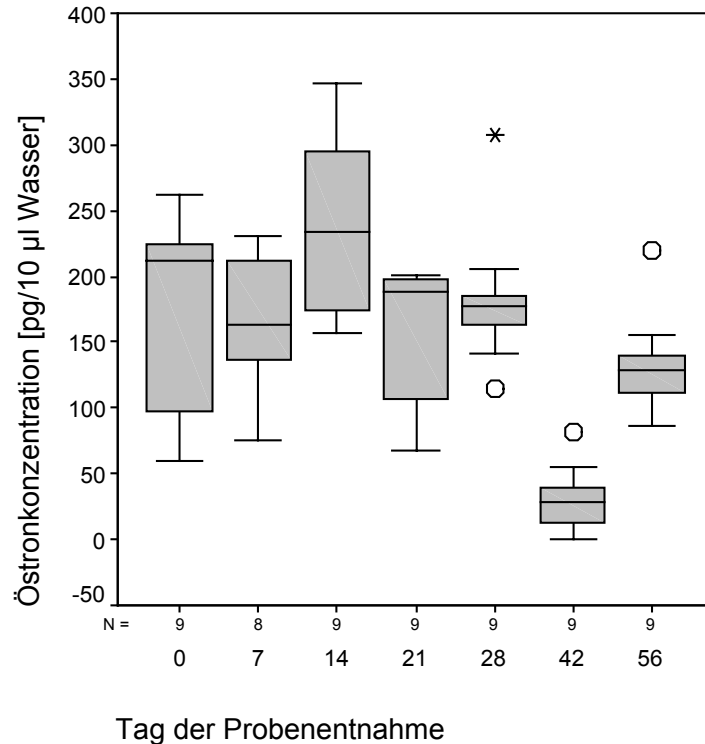
#### **4.2.3.1.2 Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit *Escherichia coli***

Im ersten Versuchsansatz war der Medianwert der Östronkonzentration am Beginn der Untersuchung mit 212,36 pg/10 µl Wasser höher als am Ende der Untersuchung mit 128,96 pg/10 µl. Die Östronkonzentration schwankte während des Untersuchungszeitraums sehr stark (Abb. 18 und Anhang Tabelle 45).

Im zweiten Versuchsansatz blieb die Östronkonzentration bis zum 21. Tag auf dem gleichen Niveau. Die Konzentration betrug am Ausgangstag 193,39 pg/10 µl Wasser und am 21. Tag 205,73 pg/10 µl. Danach fiel die Östronkonzentration am 28. Tag auf 123,12 pg/10 µl und am 56. Tag auf 100,18 pg/10 µl (Anhang Tabelle 46).

Im dritten Versuchsansatz betrug der Medianwert am Ausgangstag 193,24 pg/10 µl und am 28. Tag 148,03 pg/10 µl. Am 42. und 56. Tag lagen die Medianwerte mit 222,98 pg/10 µl bzw. 292,58 pg/10 µl höher (Anhang Tabelle 47).

Die Koloniezahl betrug am Ausgangstag  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag vergrößerte bzw. verringerte sie sich bei allen Ansätzen um maximal eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 3).



**Abb. 18: Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit einer *Escherichia coli*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

#### 4.2.3.2 Einfluss von *Pseudomonas fluorescens* auf den Verlauf der Östronkonzentration im Wasser (Versuchsserie 3b)

In der Versuchsserie 3b wurde eine *Pseudomonas fluorescens*-Suspension (s. 3.1.2.3) in sterilisiertes Flusswasser bzw. in Natriumchlorid-Lösung gegeben und mit Östronstamm-lösung (s. 3.1.4) versetzt. Der Versuch wurde dreimal angesetzt.

##### 4.2.3.2.1 Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit *Pseudomonas fluorescens*

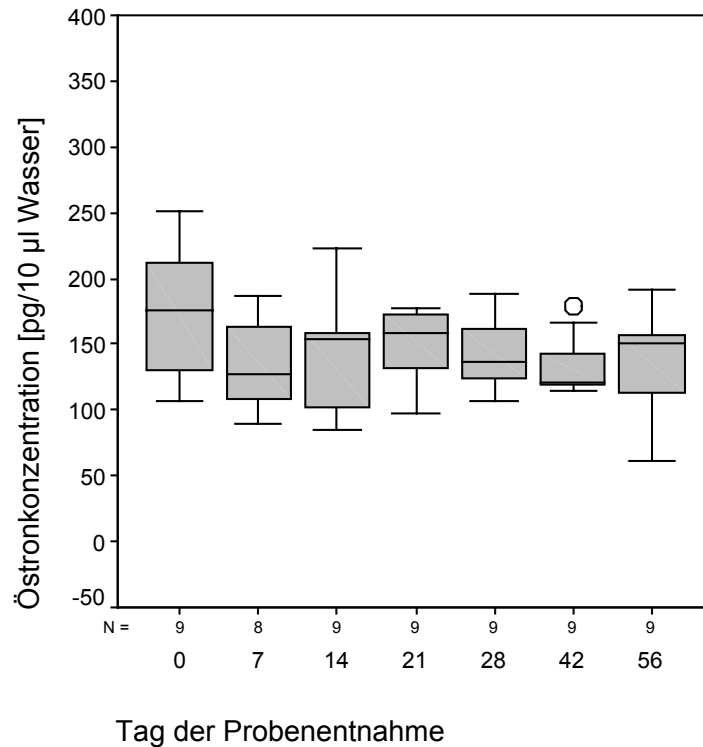
Im ersten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 176,51 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 149,94 pg/10 µl Wasser (Abb. 19 und Anhang Tabelle 48).

Im zweiten Versuchsansatz betrug die Östronkonzentration am Ausgangstag 23,11 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 17,45 pg/10 µl (Anhang Tabelle 49).

Im dritten Versuchsansatz betrug der Medianwert am Ausgangstag 95,41 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 85,55 pg/10 µl (Anhang Tabelle 50).

Der Kontrollansatz enthielt sterilisiertes Flusswasser, *Pseudomonas fluorescens*-Suspension und Assaypuffer. Die Nachweisgrenze wurde nicht überschritten.

Im ersten Versuchsansatz fiel die Koloniezahl von  $10^7$  KbE/ml während der Versuchsdauer um zwei Zehnerpotenzen und im zweiten und dritten Versuchsansatz vergrößerte sich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von  $10^6$  KbE/ml um eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 4).



**Abb. 19: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit einer *Pseudomonas fluorescens*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

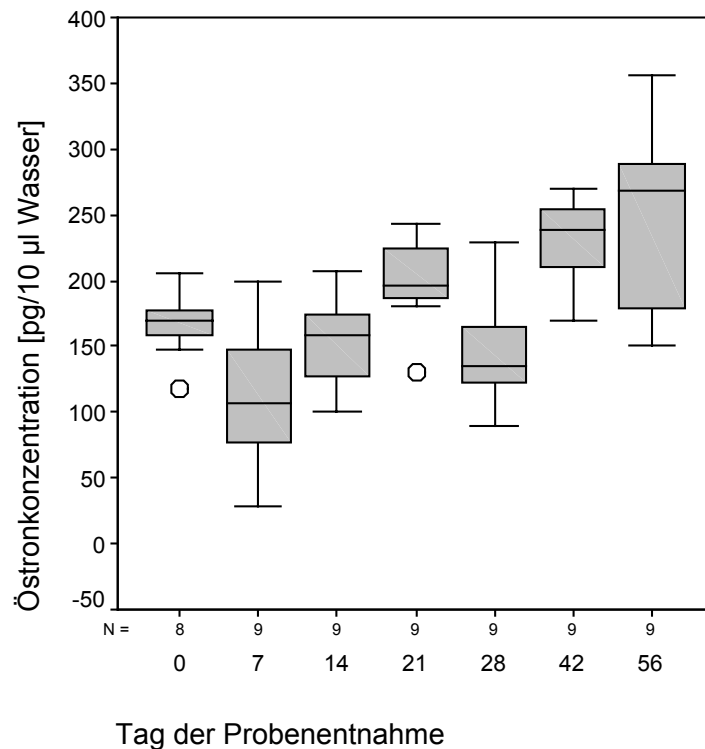
#### 4.2.3.2.2 Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit *Pseudomonas fluorescens*

Im ersten Versuchsansatz schwankte die Östronkonzentration auch stark (Abb. 20 und Anhang Tabelle 51). Am Ausgangstag betrug der Medianwert der Östronkonzentration 169,18 pg/10 µl und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 267,92 pg/10 µl Wasser.

Im zweiten Versuchsansatz verlief die Östronkonzentration bis zum 21. Tag auf einem ähnlichen Niveau. Der Medianwert betrug am Ausgangstag 32,40 pg/10 µl und am 21. Tag 45,11 pg/10 µl Wasser. Danach lagen die Östronkonzentrationen mit 206,39 pg/10 µl am 28. Tag, 111,43 pg/10 µl am 42. Tag und 176,78 pg/10 µl am 56. Tag höher (Anhang Tabelle 52).

Im dritten Versuchsansatz waren die Schwankungen wieder sehr stark. Die Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 82,53 pg/10 µl Wasser und am 56. Tag 208,79 pg/10 µl (Anhang Tabelle 53).

Die Koloniezahl betrug am Ausgangstag  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag verringert sie sich um zwei Zehnerpotenzen bzw. vergrößert sich um maximal eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 4).



**Abb. 20: Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit einer *Pseudomonas fluorescens*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

#### **4.2.3.3 Einfluss von *Aeromonas hydrophila* auf den Verlauf der Östronkonzentration im Wasser (Versuchsserie 3c)**

In Versuchsserie 3c wurde eine *Aeromonas hydrophila*-Suspension (3.1.2.3) in sterilisiertes Flusswasser bzw. in Natriumchlorid-Lösung gegeben und mit Östronstammlösung (3.1.4) versetzt. Der Versuch wurde dreimal angesetzt.

##### **4.2.3.3.1 Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit *Aeromonas hydrophila***

Im ersten Versuchsansatz blieb die Östronkonzentration während des Untersuchungszeitraums auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 21 und Anhang Tabelle 54). Der Medianwert der

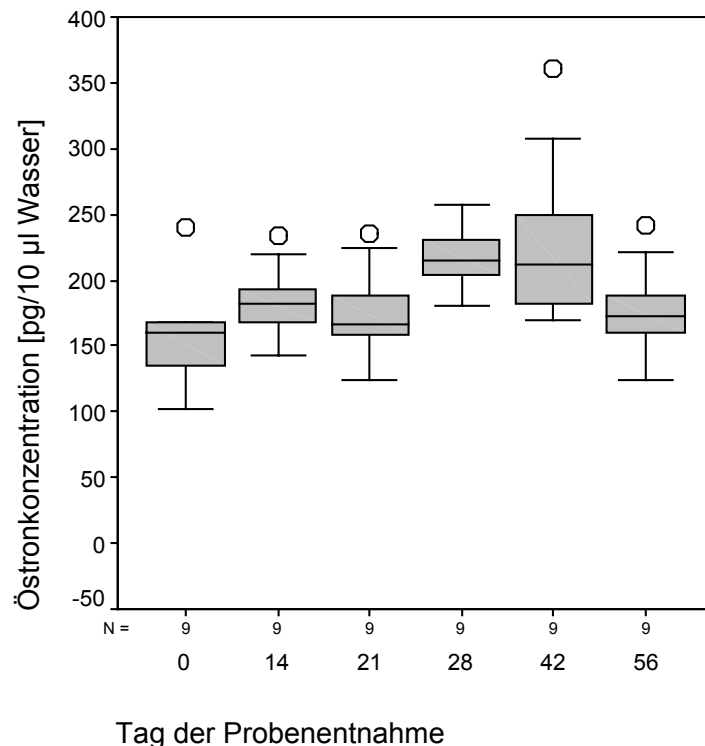
Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 159,47 pg/10 µl Wasser und am 56. Tag 172,90 pg/10 µl.

Im zweiten Versuchsansatz blieb die Östronkonzentration während des Untersuchungszeitraums wieder auf einem ähnlichen Niveau. Der Medianwert der Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 13,63 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung (56. Tag) 8,80 pg/10 µl (Anhang Tabelle 55).

Im dritten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 14,32 pg/10 µl Wasser und am Ende der Untersuchung 7,28 pg/10 µl. Die Medianwerte schwankten während des Untersuchungszeitraums (Anhang Tabelle 56).

Der Kontrollansatz enthielt sterilisiertes Flusswasser, *Aeromonas hydrophila*-Suspension und Assaypuffer. Am Ausgangstag wurden 2,50 pg/10 µl Wasser Östronäquivalente gemessen, nach einer Lagerung waren keine Östronäquivalente mehr nachweisbar.

Die Koloniezahl betrug in den Ansätzen mit Östronzugabe am Ausgangstag  $10^6$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag verringerte bzw. vergrößerte sich die Anzahl um maximal eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 5).



**Abb. 21: Verlauf der Östronkonzentration im sterilisierten Flusswasser mit einer *Aeromonas hydrophila*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

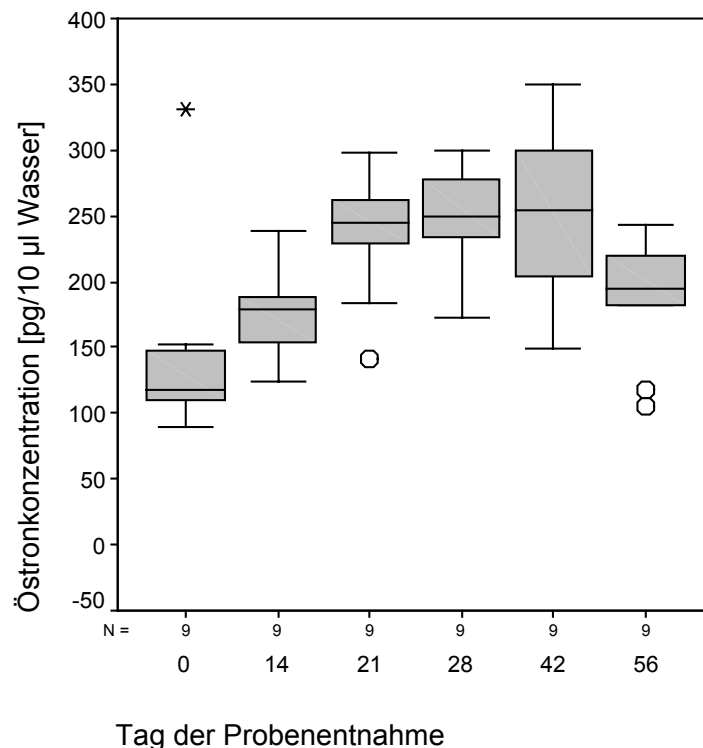
#### 4.2.3.3.2 Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit *Aeromonas hydrophila*

Im ersten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 118,48 pg/10 µl Wasser. Bis zum 42. Tag stieg die Östronkonzentration (253,84 pg/10 µl) und am 56. Tag fiel sie auf 194,79 pg/10 µl (Abb. 22 und Anhang Tabelle 57).

Im zweiten Versuchsansatz betrug der Medianwert der Östronkonzentration am Ausgangstag 11,49 pg/10 µl und am 56. Tag 16,09 pg/10 µl Wasser (Anhang Tabelle 58).

Im dritten Versuchsansatz blieb die Östronkonzentration während der Versuchsdauer fast konstant. Der Medianwert betrug am Ausgangstag 14,97 pg/10 µl und am 56. Tag 17,04 pg/10 µl Wasser (Anhang Tabelle 59).

Die Koloniezahl betrug am Ausgangstag  $10^6$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag vergrößerte sie sich bei allen Ansätzen um maximal eine Zehnerpotenz (Anhang Tabelle 5).



**Abb. 22: Verlauf der Östronkonzentration in Natriumchlorid-Lösung mit einer *Aeromonas hydrophila*-Suspension während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

#### 4.2.3.4 Wertung der Ergebnisse von den Versuchsserien 3a, b, c

Die Östronkonzentration blieb im sterilisierten Flusswasser sowie in Natriumchlorid-Lösung mit einer Suspension von *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* oder *Aeromonas hydrophila* bis zum Ende der Untersuchungen am 56. Tag erhalten. Es traten sehr starke Schwankungen der Östronkonzentration zwischen den Messtagen auf. Unterschiede zwischen dem Verlauf der Östrogenkonzentration im sterilisierten Flusswasser bzw. in Natriumchlorid-Lösung waren nicht vorhanden.

#### 4.2.4 Verlauf der 17 $\beta$ -Östadiolkonzentration im Flusswasser (Versuchsserie 4)

In der vierten Versuchsserie wurde der Konzentrationsverlauf von 17 $\beta$ -Östradiol untersucht. Es wurde angenommen, dass 17 $\beta$ -Östradiol langsamer als Östron abgebaut wird, da Östron die erste Abbaustufe von 17 $\beta$ -Östradiol ist. Es wurden zwei Varianten hergestellt:

- Variante 1: Es wurde Flusswasser verwendet und 17 $\beta$ -Östradiolstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurde sterilisiertes Flusswasser verwendet und 17 $\beta$ -Östradiolstammlösung hinzugefügt.

Die Lagerung erfolgte bei 20 °C über 56 Tage. Der Versuch wurde dreimal angesetzt.

##### 4.2.4.1 Verlauf der 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration im nicht sterilisierten Flusswasser

Im ersten Versuchsansatz war die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol am Ausgangstag mit einem Medianwert von 198,20 pg/10  $\mu$ l Wasser und am 2. Tag von 201,79 pg/10  $\mu$ l fast gleich und fiel danach steil ab. Am 6. Tag war der Medianwert auf 1,4 pg/10  $\mu$ l gesunken (ca. 1 % des Ausgangswertes). Ab dem 10. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten (Abb. 23 und Anhang Tabelle 60).

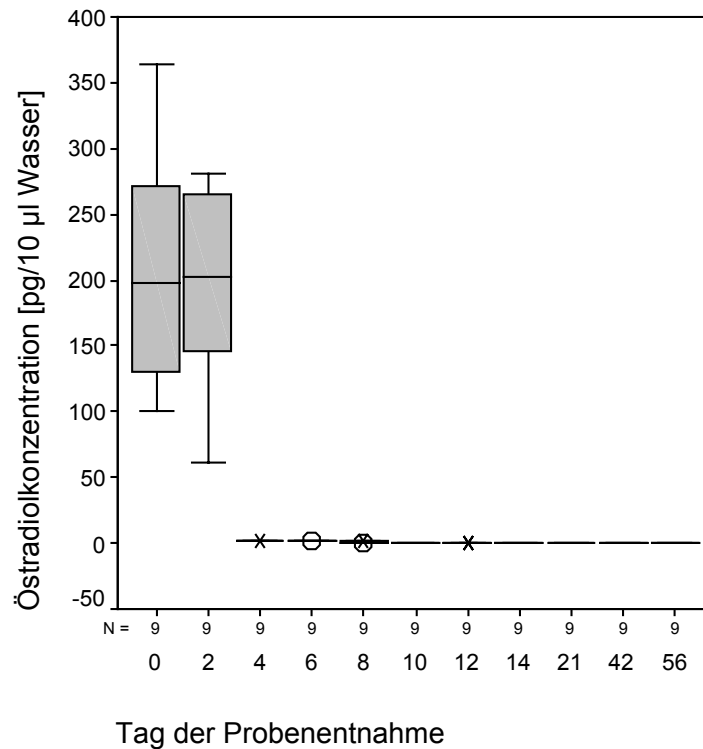
Im zweiten Versuchsansatz stieg die 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration vom Ausgangstag bis zum 2. Tag an. Der Medianwert betrug am Ausgangstag 238,88 pg/10  $\mu$ l Wasser und am 2. Tag 354,89 pg/10  $\mu$ l. Am 4. und 6. Tag fiel die Konzentration auf 94,24 bzw. 60,64 pg/10  $\mu$ l (ca. 25 % des Ausgangswertes). Ab dem 8. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten (Anhang Tabelle 61).

Im dritten Versuchsansatz stieg der Medianwert der 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration vom Ausgangstag bis zum 2. Tag von 29,64 pg/10  $\mu$ l auf 47,60 pg/10  $\mu$ l Wasser. Danach fiel die Konzentration auf 30,22 pg/10  $\mu$ l am 4. Tag und 6,69 pg/10  $\mu$ l am 6. Tag (ca. 23 % des Ausgangswertes). Ab dem 14. Tag wurde die Nachweisgrenze unterschritten (Anhang Tabelle 62).

Der Kontrollansatz enthielt Flusswasser und Assaypuffer. Im Kontrollansatz wurden keine Östronäquivalente gemessen.



Die Koloniezahl betrug in den Ansätzen mit  $17\beta$ -Östradiolzusatz am Ausgangstag  $10^3$  KbE/ml. Bis zum 56. Tag nahm sie bei allen Ansätzen um maximal zwei Zehnerpotenzen ab (Anhang Tabelle 6).

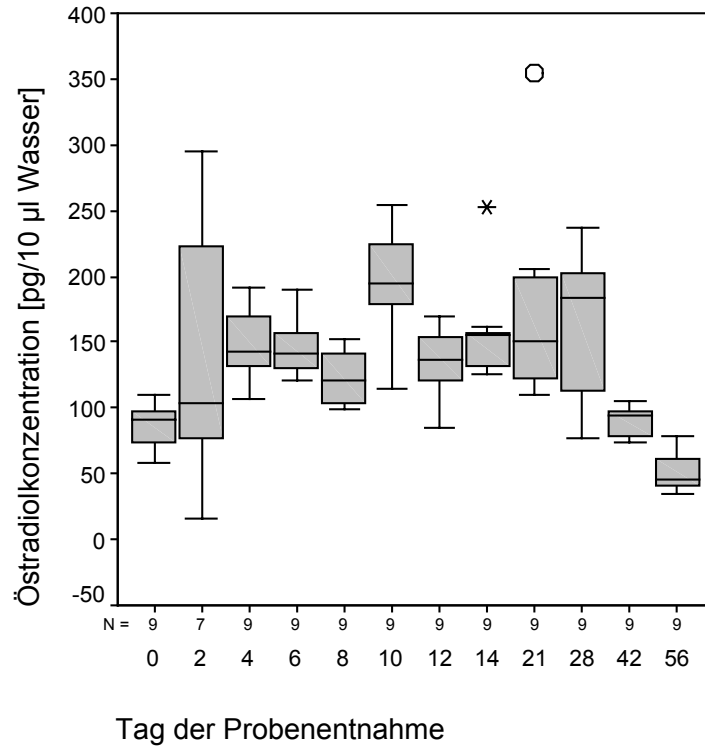


**Abb. 23: Verlauf der  $17\beta$ -Östradiolkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

#### 4.2.4.2 Verlauf der $17\beta$ -Östradiolkonzentration im sterilisierten Flusswasser

Es wurde nur ein Versuchsansatz hergestellt. Im sterilisierten Flusswasser blieb die  $17\beta$ -Östradiolkonzentration während des Untersuchungszeitraums erhalten (Abb. 24 und Anhang Tabelle 63, Anhang Tabelle 64). Der Medianwert der  $17\beta$ -Östradiolkonzentration betrug am Ausgangstag 90,44 pg/10 µl und am Ende der Untersuchung 46,20 pg/10 µl Wasser. In der Zwischenzeit lagen die Medianwerte der  $17\beta$ -Östradiolkonzentration höher als die Ausgangs- bzw. Endkonzentrationen.

Die Sterilität im sterilisierten Flusswasser wurde zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Lagerung überprüft. Sie blieb während der Versuchsdauer erhalten.



**Abb. 24: Verlauf der 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration im sterilisierten Flusswasser während einer Lagerung über 56 Tage bei 20 °C (Versuchsansatz 1)**

#### 4.2.4.3 Wertung der Ergebnisse von Versuchsserie 4

Die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol sank im Flusswasser bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C schnell ab. Nach 4 bis 12 Tagen waren über 90 % der 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration abgebaut.

Im sterilisierten Flusswasser blieb die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol bis zum Ende der Untersuchung erhalten. Zwischen den Messtagen waren Schwankungen der 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration zu beobachten.

### 4.3 Ergänzungsversuche

Die Ergänzungsversuche hatten zum Ziel, die Varianzen der Östrogenkonzentrationen während des Verlaufs zu reduzieren und eine geeignete Funktion an die Daten anzupassen.

#### 4.3.1 Reduktion der Varianzen

##### 4.3.1.1 Belegung der Mikrotiterplatten

Es wurden zunächst zwei Varianten hergestellt:

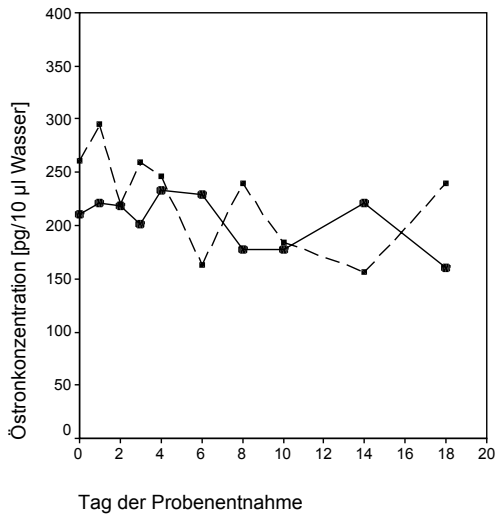
- Variante 1: Es wurde Flusswasser verwendet und Östronstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.
- Variante 2: Es wurde Flusswasser verwendet und 17 $\beta$ -Östradiolstammlösung (s. 3.1.4) hinzugefügt.

Die Lagerung der Varianten erfolgte über 18 Tage jeweils bei 5 °C und bei 20 °C.

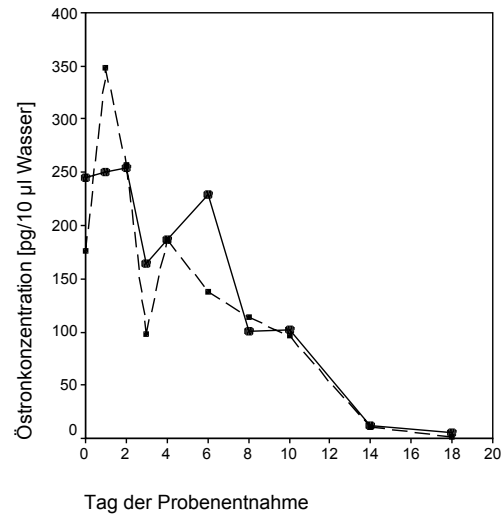
Um die Varianzen der Östrogenkonzentrationen während des Verlaufs zu reduzieren, erfolgte zunächst die Messung aller Proben einer Verlaufskurve auf einer Mikrotiterplatte. In den Hauptversuchen konnten auf einer Mikrotiterplatte nur vier verschiedene Proben untersucht werden, da jede Probe mit neun Doppelbestimmungen gemessen wurde. Das Ziel der häufigen Messung in den Hauptversuchen war, einen möglichst großen Stichprobenumfang für die Berechnung des Mittelwerts für die Östrogenkonzentration in der Probe zu erhalten. Da aber jede Mikrotiterplatte neu kalibriert werden musste, waren die Proben auf den verschiedenen Mikrotiterplatten untereinander schlechter vergleichbar. Der Messumfang wurde in den Ergänzungsversuchen auf eine Dreifachbestimmung reduziert. So konnten 20 Proben (zwei vollständige Konzentrationsverläufe) auf einer Mikrotiterplatte gemeinsam untersucht werden. Insgesamt wurden vier Mikrotiterplatten verwendet.

##### 4.3.1.2 Kalibration durch das Auswertprogramm EIA-Star

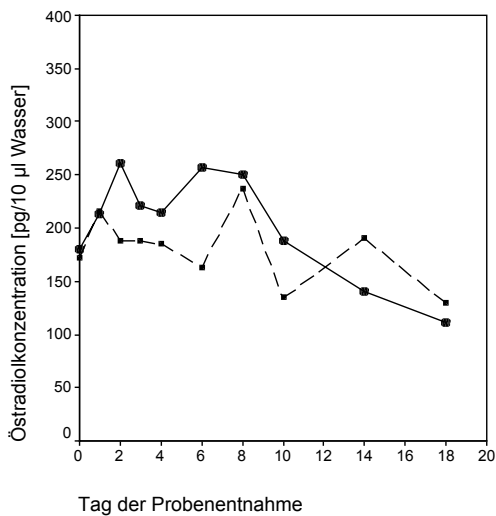
Das Abklingverhalten der Hormonkonzentrationen konnte entsprechend dem Hauptversuch beobachtet werden. Die Östronkonzentration (Variante 1) nahm bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C innerhalb des Untersuchungszeitraums von 18 Tagen nur gering ab. Die Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 210,79 pg/10  $\mu$ l Wasser und am 18. Tag 160,52 pg/10  $\mu$ l Wasser (Abb. 25). Die Messwiederholung auf einer anderen Mikrotiterplatte ergab eine Ausgangskonzentration von 261,41 pg/10  $\mu$ l Wasser und eine Endkonzentration von 239,46 pg/10  $\mu$ l Wasser (Abb. 25). Bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C fiel die Östronkonzentrationen innerhalb von 18 Tagen fast bis zur unteren Nachweisgrenze. Die Östronkonzentration betrug am Ausgangstag 250,46 bzw. 176,47 pg/10  $\mu$ l Wasser und am 18. Tag 4,77 bzw. 1,61 pg/10  $\mu$ l Wasser (Abb. 26).



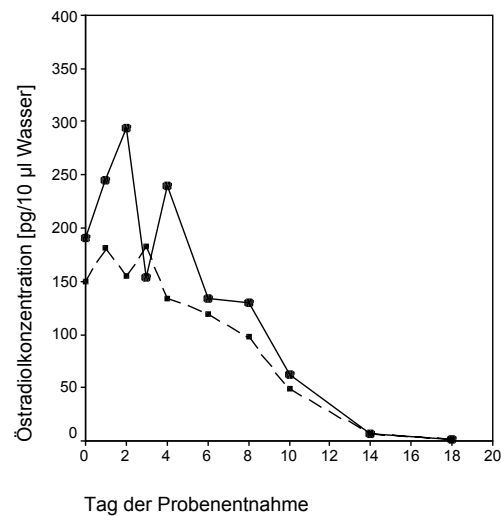
**Abb. 25: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 18 Tage bei 5 °C (Mittelwerte)**  
Platte 1, Platte 4 (---)



**Abb. 26: Verlauf der Östronkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 18 Tage bei 20 °C (Mittelwerte)**  
Platte 1, Platte 3 (---)



**Abb. 27: Verlauf der 17β-Östradiolkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 18 Tage bei 5 °C (Mittelwerte)**  
Platte 2, Platte 3 (---)



**Abb. 28: Verlauf der 17β-Östradiolkonzentration im Flusswasser während einer Lagerung über 18 Tage bei 20 °C (Mittelwerte)**  
Platte 2 (---), Platte 4

Die Verläufe der 17β-Östradiolkonzentration (Variante 2) glichen den Verläufen der Östronkonzentration. Die 17β-Östradiolkonzentration betrug bei einer Lagerung von 5 °C am Ausgangstag 180,72 bzw. 172,03 pg/10 µl Wasser und am 18. Tag 110,64 bzw. 129,25 pg/10 µl Wasser (Abb. 27). Bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C betrug die 17β-Östradiolkonzentration am Ausgangstag 149,79 bzw. 191,07 pg/10 µl Wasser und am 18.

Tag 1,78 bzw. 1,28 pg/10 µl Wasser (Abb. 28). Die Varianzen konnten kaum reduziert werden.

#### 4.3.1.3 Kalibration durch eine logistische Funktion

Das Auswertprogramm EIA-Star ist für die Bestimmung von Einzelproben konzipiert. Die Konzentration der Probe soll im mittleren Bereich der Standardkurve liegen. Um den linearen Verlauf im mittleren Bereich der Standardkurve zu verlängern, werden die äußeren Bereiche der Standardkurve durch das Programm verzerrt. Da in den Untersuchungen aber Konzentrationsverläufe gemessen wurden, die z. T. mit sehr hohen Konzentrationen beginnen und auf sehr niedrige Konzentrationen sinken, wurden auch die äußeren Bereiche der Standardkurve zur Berechnung der Konzentration benötigt.

Daher erfolgte die Kalibration im Ergänzungsversuch abweichend vom Auswertprogramm EIA-Star noch einmal direkt zwischen den Medianen der OD-Werte und den Konzentrationsstufen. Zur Datenverdichtung wurde der Medianwert statt des Mittelwerts aus der Dreifachbestimmung verwendet. Dadurch konnte der Einfluss einzelner extremer Messfehler gedämpft werden.

Auf eine Normierung der OD-Werte durch Berechnung der prozentualen Bindung wurde verzichtet. Die unspezifische und die maximale Bindung dienten lediglich als Kontrollwerte für die erhaltenen Beziehungen bei der Kalibration. Bei der Kalibration wurde der OD-Wert  $x_i$  als abhängige Variable und die Konzentrationsstufe  $S_i$  zur Konzentration  $y_i$  als unabhängige Einstellgröße betrachtet. Die Regression in Bezug auf die logistische Funktion

$$x_i = \frac{a}{1 + e^{b+c \cdot S_i}}$$

$x_i$  = OD-Wert (des Standardpunkts)  
 $S_i$  = Konzentrationsstufe  
 a, b, c = Koeffizienten

beschrieb den Zusammenhang von OD-Werten  $x_i$ ,  $i = 1 \dots 9$  und Konzentrationsstufen  $S_i$ . Die logistische Funktion verband die Standardpunkte sehr gut zur Standardkurve (Abb. 29).

Nach Bestimmung der Schätzung der Koeffizienten  $\hat{a}, \hat{b}, \hat{c}$  ließ sich die Formel nach  $\hat{S}_i$  umstellen:

$$\hat{S}_i = \frac{\ln\left[\left(\frac{\hat{a}}{x_i} - 1\right) - \hat{b}\right]}{\hat{c}}$$

$x_i$  = OD-Wert (des Standardpunkts bzw. der Probe)  
 $\hat{S}_i$  = geschätzte Konzentrationsstufe  
 $\hat{a}, \hat{b}, \hat{c}$  = geschätzte Koeffizienten

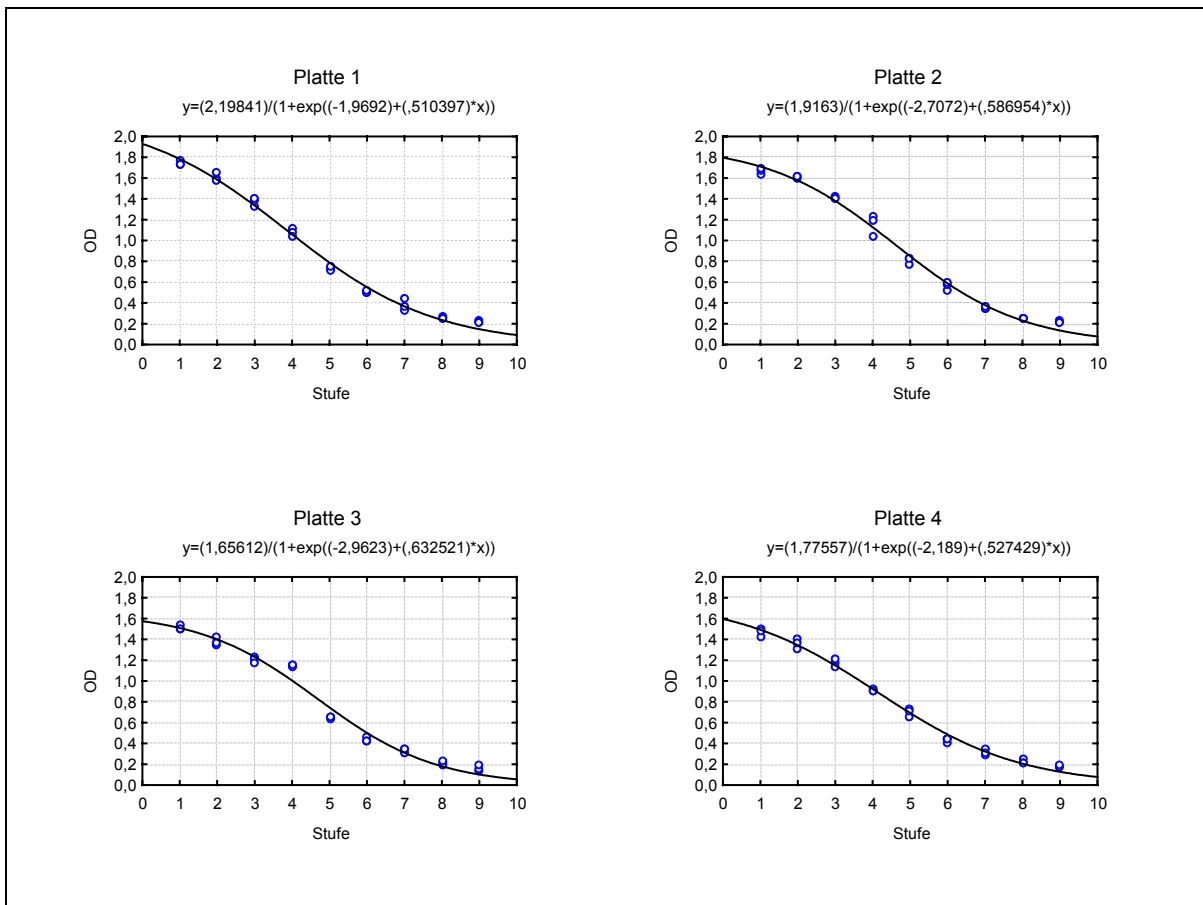
Die Konzentrationsstufe  $\hat{S}_i$  variierte dabei stetig, um eine präzise Bestimmung der Konzentration zu ermöglichen. Die OD-Werte der Proben wurden in die Formel eingesetzt. Aus den Konzentrationsstufen  $\hat{S}_i$  ergaben sich die Konzentrationen  $y_i$  für die Proben:

$$y_i = (2,5)^{\hat{S}_i} \cdot 0,131072.$$

$y_i$  = Konzentration (der Probe)

$\hat{S}_i$  = geschätzte Konzentrationsstufe

Diese Kalibration führte zu geringeren Konzentrationswerten, als die Kalibration durch das Programm EIA-Star. Die Ergebnisse waren plausibel, da sie den rechnerisch eingesetzten Konzentrationen von 150 pg/10 µl Wasser sehr nahe kamen (s. Anhang Tabelle 65 bis Anhang Tabelle 72).



**Abb. 29: Standardkurven für die vier Mikrotiterplatten des Ergänzungsversuchs**

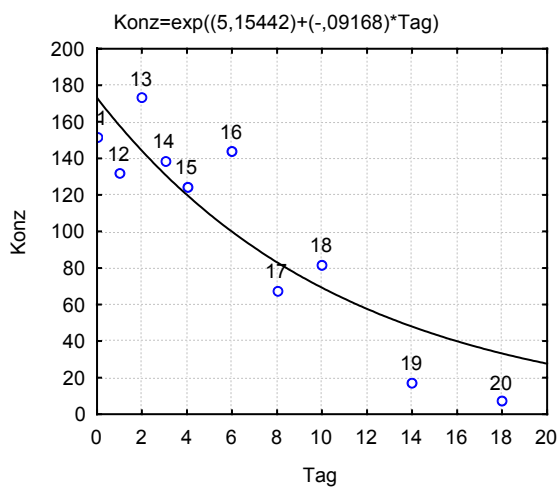
### 4.3.2 Anpassung einer Funktion an die Daten

Es wurden die Daten verwendet, die bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C mit der Kalibration durch eine logistische Funktion gewonnen wurden (s. 4.3.1.3). Verschiedene Modelle von exponentiellem Typ waren geeignet, plausible Beschreibungen des Konzentrationsabbaus zu liefern. Dazu wurden verschiedene Regressionsfunktionen  $g(t)$ , die einem Zufallseinfluss  $\varepsilon(t)$  unterlagen, betrachtet. Damit ergab sich für die Konzentration folgendes Regressionsmodell:  $Y(t) = g(t) + \varepsilon(t)$ .

#### 4.3.2.1 Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Daten

Beim einfach exponentiellen Modell der Konzentrationsabnahme verläuft die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme proportional zur Konzentration selbst. Dem entspricht die Funktion  $g(t) = b \cdot e^{c \cdot t}$ .

Diese Funktion  $g(t)$  hat keine Extremwerte und Wendepunkte. Bei der Regression ist die Zeit  $t$  die unabhängige und die Konzentration  $Y(t)$  die abhängige Variable. Die Anpassung an die exponentielle Funktion war unzureichend (Abb. 30 bis Abb. 33). Die Summe der quadratischen Abweichungen lag deutlich höher als bei den anderen Modellen.



Platte 1

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

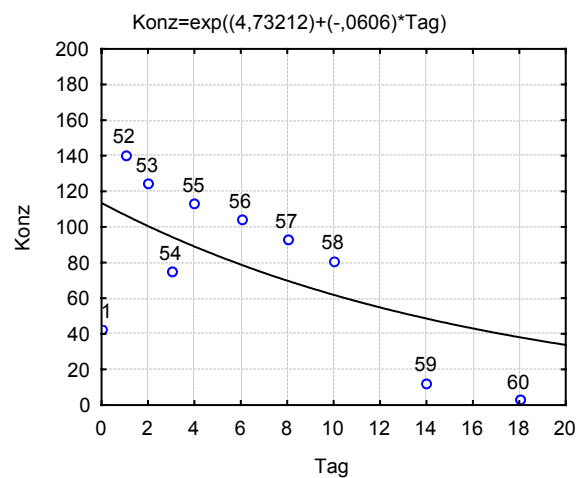
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 6024,9721

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,7982; R=0,8934

**Abb. 30: Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 3

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

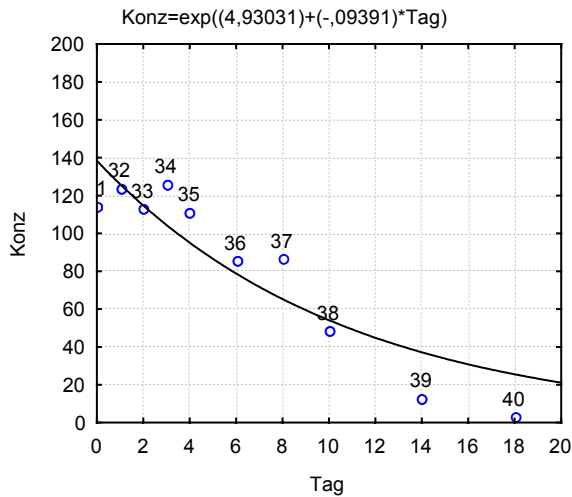
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 11866,4102

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,6692; R=0,8181

**Abb. 31: Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 2

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

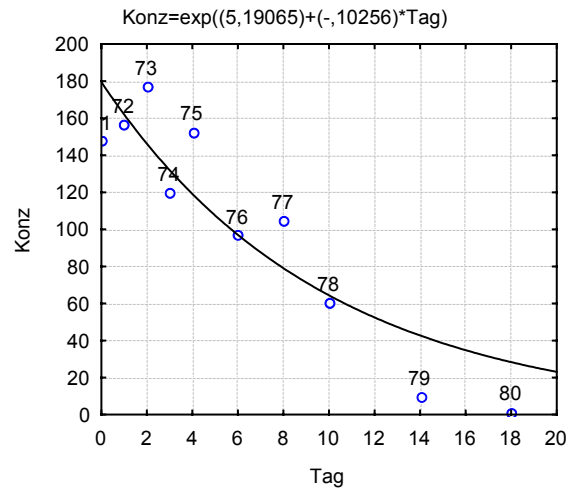
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 2930,0147

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,8433; R=0,9183

**Abb. 32: Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**



Platte 4

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 5746,4347

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,7146; R=0,8453

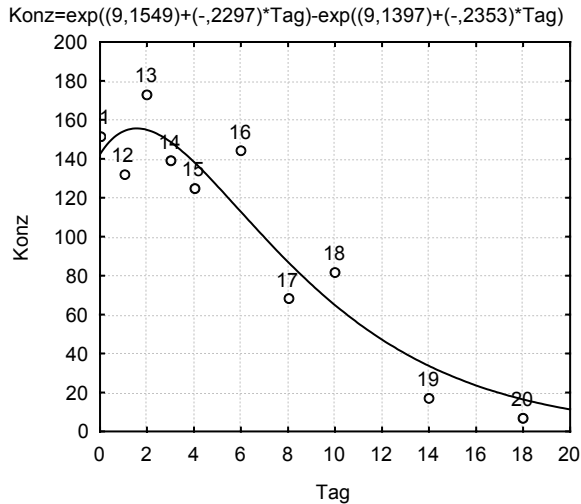
**Abb. 33: Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**

#### 4.3.2.2 Anpassung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Daten

Bei diesem Modell erfolgt der Abbau des Östrogens wieder exponentiell, aber in zwei Stufen. In der ersten Stufe wird zunächst ein weiteres Produkt mit östrogener Struktur angereichert, das ebenso einem exponentiellen Abbau unterliegt. Die Untersuchung dieses Modells liegt nahe, weil z. B. der Abbau von 17β-Östradiol über das Zwischenprodukt Östron verläuft. Die als Lösung erhaltene Regressionsfunktion  $g_2(t) = b_1 \cdot e^{c_1 \cdot t} + b_2 \cdot e^{c_2 \cdot t}$  hat ein lokales Maximum, wenn Freisetzung und Abbau des Zwischenprodukts ins Gleichgewicht kommen. So ist sie geeignet, Daten anzupassen, die nicht sofort abfallen, sondern bis zu einem Maximalwert ansteigen können, wie das bei den erhaltenen Messwerten z. T. vorkommt.

Die Anpassung an die doppelt exponentielle Funktion erforderte genaue Anfangswerte und bereitete numerische Probleme. Die Lösung bei Platte 3 wurde nur dadurch erreicht, dass die Parameter paarweise optimiert wurden (Abb. 34 bis Abb. 37).





Platte 1

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

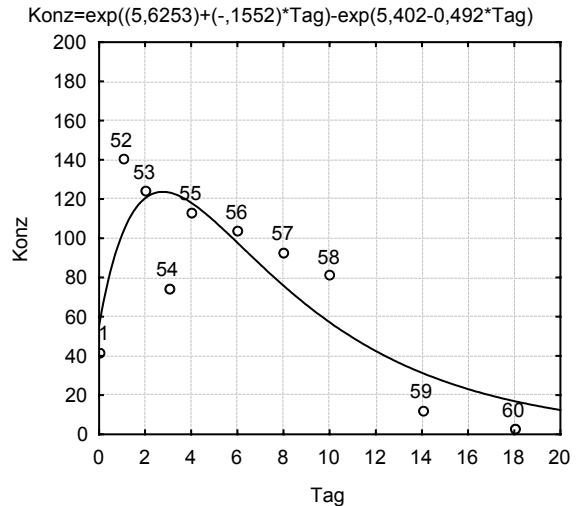
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 3191,2275

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,8931; R=0,9450

**Abb. 34: Anpassung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 3

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

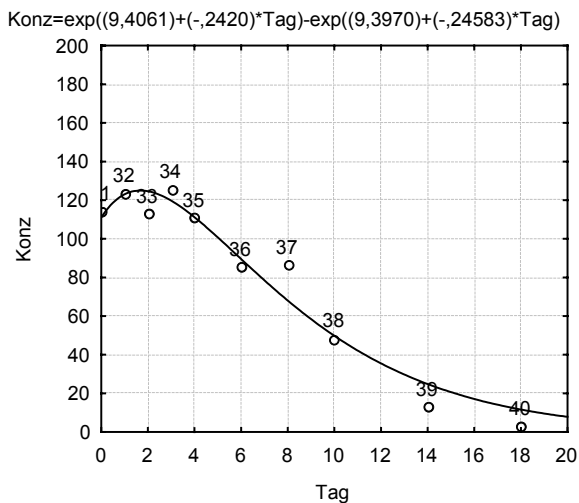
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 5555,4939

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,7146; R=0,8453

**Abb. 35: Anpassung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 2

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

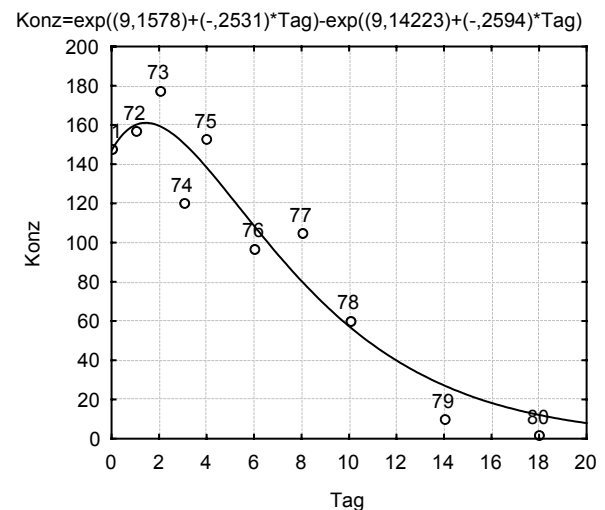
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 759,3199

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz 0,9594; R=0,9795

**Abb. 36: Anpassung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**



Platte 4

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 2655,0333

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz 0,9218; R=0,9601

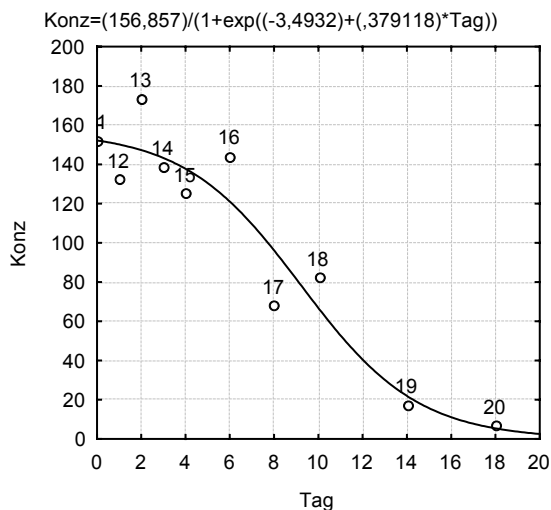
**Abb. 37: Anpassung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**

### 4.3.2.3 Anpassung einer logistischen Funktion an die Daten

Die logistische Funktion beschreibt Vorgänge, bei denen die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme autokatalytisch ist. Das bedeutet, die Konzentrationsabnahme beginnt zunächst langsam. Anschließend wird der größte Teil der Konzentration schnell abgebaut. Sobald die Konzentration gering geworden ist, verlangsamt sich der Abbau wieder. Die logistische Funktion  $g_l(t) = \frac{a}{1 + b \cdot e^{ct}}$  ist ein geeigneter Repräsentant der sigmoiden Funktionen.

Von einem Höchstwert  $a$  fällt die Funktion zunächst flach, dann steiler bis zum Wendepunkt, um danach wieder abzuflachen und sich der Null zu nähern.

Die logistische Funktion erreichte für die Platten 1, 2, 4 die kleinste Summe der Abweichungsquadrate und eine gute Anpassung an den Verlauf der Messwerte (Abb. 38, Abb. 40, Abb. 41). Die Werte 51 und 54 zu Platte 3 entzogen sich einer monotonen Anpassung. Die Anpassung dieser Verlaufskurve war numerisch ebenfalls schwierig (Abb. 39).



Platte 1

Konz: Konzentration in pg/10  $\mu$ l Wasser

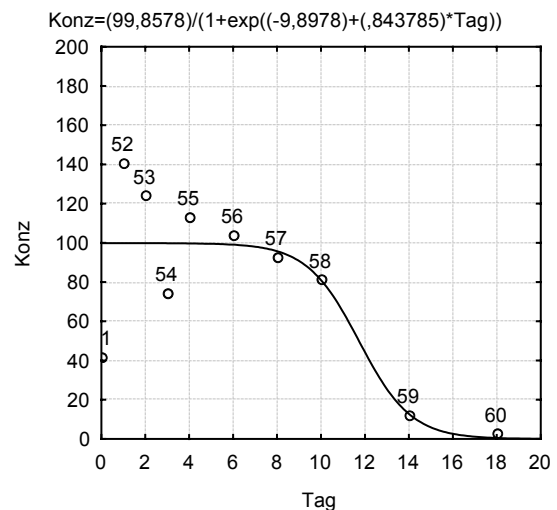
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 2778,2724

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,9069; R=0,9523

**Abb. 38: Anpassung einer logistischen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 3

Konz: Konzentration in pg/10  $\mu$ l Wasser

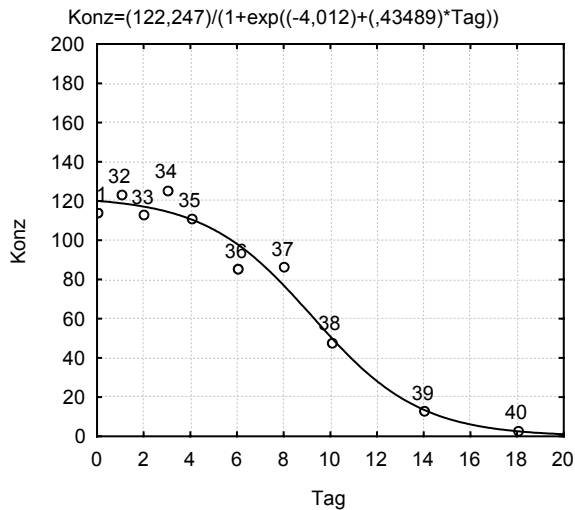
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 6438,3498

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,6692; R=0,8181

**Abb. 39: Anpassung einer logistischen Funktion an die Konzentrationswerte von Östron (20 °C)**



Platte 2

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

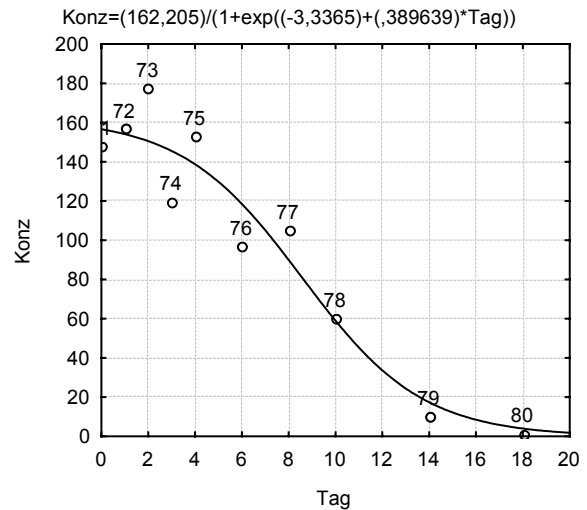
Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 456,5571

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,9756; R=0,9877

**Abb. 40: Anpassung einer logistischen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**



Platte 4

Konz: Konzentration in pg/10 µl Wasser

Tag: Zeit in Tagen

Summe der kleinsten Quadrate: 2409,1115

Anteil der Regressionsfunktion an erklärter

Varianz: 0,9290; R=0,8539

**Abb. 41: Anpassung einer logistischen Funktion an die Konzentrationswerte von 17β-Östradiol (20 °C)**

#### 4.3.3 Wertung der Ergebnisse des Ergänzungsversuchs

Von Vorteil war die Verwendung von nur einer Mikrotiterplatte für eine Verlaufsuntersuchung, da die Fehler reduziert wurden, die sich besonders im Interassay ausdrücken. Auch die Dreifachbestimmung der Konzentration mit anschließender Mittelung über den Medianwert war geeignet, um Fehler von extrem abweichenden Messwerten zu reduzieren. Auf eine Normierung der OD-Werte konnte verzichtet werden, da so auch hohe und niedrige Konzentrationswerte korrekt berechnet wurden. Die Varianzen im Konzentrationsverlauf konnten reduziert werden.

Die logistische Funktion war für die Erstellung der Standardkurve sehr gut geeignet und sie ließ sich am besten an die Messwerte anpassen.