

2. LITERATUR

2.1 Endokrine Disruptoren in der Umwelt

Der potenzielle Einfluss von Umweltchemikalien auf die Gesundheit und insbesondere auf das Hormonsystem von Menschen und Tieren erlangte in den letzten Jahren vermehrt öffentliches Interesse. Stoffe aus der chemischen Industrie, Landwirtschaft und Medizin gelangen seit Jahrzehnten in die Umwelt. Besonders Oberflächengewässer sind einer hohen Kontamination mit diesen Substanzen ausgesetzt.

Exogene Stoffe, die nach Aufnahme durch Störungen des Hormonsystems die Gesundheit von Lebewesen beeinträchtigen, werden als endokrine Disruptoren bezeichnet. Des Weiteren sind als potenziell endokrin wirksame Substanzen solche Stoffe definiert, die bislang nur in *in-vitro*-Tests diese Wirkungen zeigten (Weybridge Conference, 1996). Endokrine Disruptoren binden an körpereigene Hormonrezeptoren und können so hormonagonistische oder –antagonistische Wirkungen hervorrufen (Jobling et al., 1995, Wuttke et al., 1999). Pickering und Sumpter (2003) fordern, dass der Begriff endokrine Disruptoren besonders für die Stoffe reserviert bleibt, die direkt auf das endokrine System einwirken. Stoffe, die sekundär durch toxische Eigenschaften das Hormonsystem stören, sollten nicht dazu zählen. Charakteristisch für endokrine Disruptoren ist die Eigenschaft, dass sie auch in extrem geringen Konzentrationen große biologische Wirkungen entfalten können.

Von besonderer Bedeutung sind Stoffe mit Wirkung auf das Sexualhormonsystem. Bislang wurden hauptsächlich östrogenartige Wirkungseigenschaften endokriner Disruptoren entdeckt und untersucht. Zu den östrogen wirksamen Stoffen in der Umwelt werden Xenoöstrogene, Phytoöstrogene sowie synthetische und natürliche Östrogene gezählt.

Xenoöstrogene sind Chemikalien, bei denen eine (potenziell) östrogene Aktivität vorliegt. Es konnten bereits hunderte Chemikalien mit östrogenen Wirkung nachgewiesen werden (Gülden et al., 1997). Relevante Beispiele aus Industrie und Landwirtschaft sind DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan), Bisphenol A und Nonylphenol. Seit Ende der sechziger Jahre ist die hormonelle Wirksamkeit von DDT bekannt (Bitman et al., 1968). 1994 stellten Guillette et al. fest, dass sich die Population juveniler Alligatoren im stark mit DDT und Dicofol belasteten Lake Apopka in Florida verringerte. Es konnten Veränderungen der Geschlechtsorgane in Form

von Verminderung der Penisgröße und unterentwickelten Hoden sowie Veränderungen der Geschlechtshormonkonzentrationen im Blut aufgezeigt werden. Weiterhin war die Zahl der ausgebrüteten Eier verringert und die Follikelbildung und Oozytenentstehung bei weiblichen Tieren fehlerhaft (Guillette et al., 1996). In Deutschland ist die Anwendung von DDT seit 1997 verboten (Bund für Umwelt und Naturschutz e.V., 2001). Bisphenol A gehört zu den weltweit am meisten produzierten Chemikalien. Es wird als Weichmacher hauptsächlich bei der Erzeugung von Kunststoffen eingesetzt und kommt z. B. auch in Zahnfüllmaterial vor. Sowohl in in-vitro- als auch in in-vivo-Untersuchungen zeigte Bisphenol A schwach östrogenartige Eigenschaften (Krishnan et al., 1993). Nonylphenol ist ein Abbauprodukt nichtionischer Tenside mit östrogenen Wirksamkeit, das vor allem in kommunalen Abwässern nachgewiesen wurde (Spengler, 2001).

Östrogenähnlich wirkende Substanzen werden auch von vielen Pflanzen produziert, die Menschen und Tiere täglich mit der Nahrung aufnehmen. Roter Klee, Luzerne und Sojabohnen sind besonders reich an solchen Phytoöstrogenen. Sie kommen aber auch in der Milch vor (Wuttke et al., 1999). In den vierziger Jahren stellte sich erstmals heraus, dass es bei weiblichen Schafen, die bestimmte Sorten des Erdklee gefressen hatten, vermehrt zu Fertilitätsstörungen kam (Müller et al., 1989). Mykoöstrogene können bei Pilzbefall von Getreide und anderen Pflanzen entstehen und ebenfalls östrogenartige Eigenschaften von Nahrungsmitteln bewirken (Jungbauer und Graumann, 1998).

Umweltbelastungen durch synthetische Hormone sind besonders von Sexualhormonen zur oralen Kontrazeption beim Menschen und zur Zyklusbeeinflussung und Therapie von Reproduktionsstörungen beim Tier zu erwarten (Lange et al., 2002, Ternes et al., 2003b). So wurden 1993 in Deutschland 263 Millionen Tagesdosen an Kontrazeptiva verordnet (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 2000). Synthetische Sexualhormone wie 17 α -Ethinylöstradiol (verabreichte Menge in Deutschland ca. 50 kg pro Jahr), Medroxyprogesteron und Hydroxyprogesteroncaproat bilden zudem den Haupteintrag an endokrin wirksamen Arzneimitteln in die Umwelt (Landesumweltamt Brandenburg, 2000, Gies et al., 2001). Außerhalb der Europäischen Union ist es zulässig, Tieren auch hormonhaltige Futtermittelzusatzstoffe in Form von Anabolika (Wachstumsförderer bei der Massentierhaltung) zu verabreichen. Anabolika können synthetische Hormone wie Trenbolon und Zeranol, aber auch natürliche Sexualhormone wie Östradiol, Testosteron und Progesteron enthalten. Die Entwicklung synthetischer Steroide wurde im Vergleich zu natürlichen Steroiden vorangetrieben,

weil sie in synthetischer Form stabiler gegenüber Biotransformationen und der damit verbundenen Deaktivierung sind. Dadurch ist auch eine höhere Persistenz in der Umwelt zu erwarten. Metabolite von synthetischen Hormonen werden ebenso wie die natürlichen Hormone mit Urin und Faeces ausgeschieden (Lange et al., 2002). Das synthetische Östrogen Diethylstilböstrol, welches vor einigen Jahren zur Abortvorbeugung eingesetzt wurde, bewirkte schwere Schädigungen am Genitaltrakt der männlichen und weiblichen Nachkommen. Solche Effekte könnten auch durch aus der Umwelt aufgenommene synthetische Östrogene hervorgerufen werden (Newbold, 1995).

Eine hohe östrogene Wirksamkeit besitzen die natürlichen Östrogene, die von Frauen und weiblichen Tieren besonders im letzten Drittel der Gravidität in hohen Konzentrationen ausgeschieden werden (Hoffmann, 1994, Ying et al., 2002). Zu den wichtigsten natürlichen Östrogenen gehören 17α - und 17β -Östradiol, Östron und Östriol (Bamberg, 1994).

Über den Weg der Ausscheidungen von Menschen und Tieren gelangen synthetische und besonders natürliche Hormone wie Gestagene, Östrogene und Androgene in die Umwelt. Über das Abwassersystem werden von Menschen ausgeschiedene Hormone den kommunalen Kläranlagen und von dort mit dem gereinigten Abwasser den Fließgewässern zugeführt (Desbrow et al., 1998). Die Belastung der Gewässer steht in engem Zusammenhang mit dem jeweilig enthaltenen Abwasseranteil (Ternes, 1998). Durch die Ausbringung von Gülle und Dung auf landwirtschaftliche Nutzflächen gelangen Hormone landwirtschaftlicher Nutztiere in den Boden und in das Grundwasser, durch Abspülung auch in Oberflächengewässer (Desbrow et al., 1998, Ternes, 1998). Die Entsorgung von Hormonpräparaten über den Hausmüll kann bei Undichtigkeiten der Deponien zu einer Grundwasserbelastung führen. Oberflächenwasser besteht zu einem Teil aus Grundwasser und ist somit auch von Grundwasserbelastungen betroffen. Umgekehrt betrifft eine Belastung des Oberflächenwassers auch das Grundwasser, z. B. durch Uferfiltration (Ternes et al., 2003b).

Die Rolle endogener (natürlicher) Hormone am Eintrag endokrin wirksamer Substanzen in die Umwelt wurde bisher eher vernachlässigt. Zwar gelangen physiologische Hormone schon seit Jahrtausenden über menschliche und tierische Ausscheidungen in die Umwelt, jedoch ist der immense Bevölkerungszuwachs und die intensive Landwirtschaft (Massentierhaltung) für einen beachtlichen Anstieg dieser Stoffe in der Umwelt verantwortlich (Lange et al., 2002).

Es ist bislang nicht bekannt, ob mikrobiell-enzymatische Prozesse einer Kumulation von Hormonen im Oberflächenwasser entgegenwirken. Über Progesteron gibt es zum Vorkommen in der aquatischen und terrestrischen Umwelt kaum Angaben.

2.1.1 Auswirkungen endokriner Disruptoren auf Lebewesen

Früher nahm man an, endokrin wirksame Stoffe würden nur in hohen Konzentrationen (etwa Millionstel bis Tausendstel Gramm pro Liter) negative Wirkungen auf Individuen erzielen. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass es auch bei sehr geringen Konzentrationen (Milliardstel bis Billionstel Gramm pro Liter) zu langfristigen Effekten auf das Hormonsystem und somit zu Fruchtbarkeitsstörungen und Verhaltensänderungen kommen kann (Bund für Umwelt und Naturschutz e.V., 2001). Natürliche und synthetische Östrogene sind bereits im ng/l-Bereich wirksam (Purdom et al., 1994).

Hormonaktive Substanzen haben eine Affinität zu zellulären Hormonrezeptoren. Nach Kontakt mit den Rezeptorproteinen können sie eine Wirkungskaskade hervorrufen oder eine Blockade der Rezeptoren bewirken. Die Wechselwirkungen der endokrinen Disruptoren mit den Rezeptoren können vielseitig sein, insbesondere wenn verschiedene Stoffe gemeinsame Affinitäten zum Rezeptor haben (Jobling et al., 1995, Arnold et al. 1996, McLachlan, 1997, Landesumweltamt Brandenburg, 2000).

Endokrine Disruptoren können sowohl während der Embryonalentwicklung als auch während des gesamten Lebens auf den Organismus einwirken (Crisp et al., 1998). Zusammen mit den physiologischen Hormonen können sie bei Menschen und Tieren additiv auf den Organismus einwirken, z. B. eine gesteigerte Hormonwirkung hervorrufen. Die Entwicklungsphase des Körpers spielt dabei eine bedeutende Rolle, ebenso wie die Wirkungseigenschaft der Substanz. Es kann sich bei der Stoffwirkung um einen östrogenen bzw. antiöstrogenen oder androgenen bzw. antiandrogenen Effekt handeln (Sonnenschein und Soto, 1998, Bund für Umwelt und Naturschutz e.V., 2001). Exogene Stoffe, die die Östrogenbalance während der kritischen Lebensphasen (Embryonalphase, sexuelle Differenzierung, Kindheit) beeinflussen, können die sexuelle Differenzierung der Reproduktionsorgane und die Entwicklung bestimmter Kerngebiete des Gehirns maßgeblich stören. Dabei kann es zu einem Umbau der Gonaden und der akzessorischen Geschlechtsorgane sowie zu Änderungen im Verhalten kommen (Larsson et al., 1999, Brunström et al., 2002, Hill und Janz, 2003). Als Folge des Einflusses

östrogener Umweltchemikalien (z. B. Octylphenol, Butylbenzylphthalat) auf die Entwicklung männlicher Ratten im Uterus bzw. in den ersten 21 Tagen nach der Geburt beschrieben Sharpe et al. (1995) eine Abnahme der Hodengrößen sowie der täglichen Spermienproduktion beim erwachsenen Tier.

Im Zusammenhang mit den Wirkungen endokrin wirksamer Stoffe sind bei zahlreichen Wildtieren Verweiblichung und Abnahme der Fertilität beobachtet worden (Guillette et al., 1994, Purdom et al., 1994, Fry, 1995, Toppari et al., 1996). In England wurden östrogene Effekte bei Fischen beobachtet, die sich in Gewässern unterhalb von Kläranlagenabläufen aufhielten. Männliche Regenbogenforellen bildeten Vitellogenin, ein Dotterprotein, das natürlicherweise nur bei geschlechtsreifen Weibchen vorkommt. Die damit verbundene Verweiblichung männlicher Fische und die Entstehung von Hermaphroditismus wurde auf in Kläranlagenabläufen enthaltene Östrogene zurückgeführt (Purdom et al., 1994, Sumpter und Jobling, 1995, Desbrow et al., 1998, Jobling et al., 1998, Tilton et al., 2002). Besonders das synthetische 17α -Ethinylöstradiol sowie die natürlichen Östrogene Östron und 17β -Östradiol werden neben den Xenoöstrogenen für diese Veränderungen verantwortlich gemacht (Larsson et al., 1999, D'Ascenzo et al., 2003). Auch Flohkrebse konnten durch Östrogene geschädigt werden (Vandenbergh et al., 2003). Bei Meeres- und Süßwasserschnecken ließ sich in Abhängigkeit von Gewässerbelastungen mit Tributylzinnverbindungen Vermännlichung bei weiblichen Tieren und Unfruchtbarkeit bei männlichen Tieren nachweisen (Kalbfus, 1998).

Colborn et al. (1993) schreiben endokrinen Disruptoren auch einen schädigenden Einfluss beim Menschen zu. Untersuchungen von Foster et al. (2002) weisen im 2. Drittel der Schwangerschaft bei 25 % der untersuchten Frauen p,p'-DDE (ein Metabolit des DDT) und bei 96 % ein Phytoöstrogen in der Amnionflüssigkeit nach. Die Konzentrationen der Stoffe lagen in den hohen pg/ml Bereichen, womit sie direkten Einfluss auf die Entwicklung des Fetus nehmen könnten. Für Veränderungen der männlichen Reproduktionsorgane wie Hodenhochstand und Hodenkrebs (Toppari et al., 1996) sowie für die Entstehung von Brustkrebs bei Frauen (Falck et al., 1992, Davis et al., 1993) werden endokrine Disruptoren verantwortlich gemacht. Auch Pflanzen können durch solche Stoffe beeinflusst werden (Shore et al., 1995).

Besonders in den Ausscheidungen trächtiger Tiere sind biologisch aktive Östrogene enthalten, die vor allem durch orale Aufnahme, aber auch durch Resorption über die Haut einen anderen Organismus schädigen können. In diesem Zusammenhang beobachtete Watkins (1995) Fortpflanzungsstörungen bei Färsen, die auf Einstreu von hochtragenden Stuten gehalten wurden.

In Untersuchungen von Shore et al. (1988) zeigten Färsen Euterwachstum und Laktation, nachdem sie mit siliertem Hühnerkot gefüttert worden waren. Außerdem zeigten sich Störungen im Hormonsystem bei Fischen, nachdem Wasser von Viehweiden in Flüsse und Seen abgespült worden war (Orlando et al., 2004).

Lebewesen sind nicht nur dem Einfluss einzelner exogener Substanzen ausgesetzt. Vielmehr wirken auch Stoffmixturen auf das Hormonsystem. Ihre Effekte auf Individuen sind durch die hohe Komplexität der Wirkungskombinationen unvorhersehbar und schwer einzuschätzen (Carpenter et al., 2002). Eine Beteiligung von Progesteron ist dabei nicht auszuschließen. Vonier et al. (1996) testeten in diesem Hinblick einige Umweltchemikalien in Bezug auf ihre Bindung an Östrogen- bzw. Progesteron-Rezeptoren bei amerikanischen Alligatoren. Bei Kombination der Stoffe, die eine Affinität zum Rezeptor hatten, war die Bindung stärker als additiv. Das lässt darauf schließen, dass Interaktionen solcher Stoffe mit dem endokrinen System sehr komplex sind. Auch Sumpter (1998) vermutet, dass Stoffmixturen für Effekte auf das Reproduktionssystem bei Fisch fressenden Tieren verantwortlich sind. Obwohl Larsson et al. (1999) anhand eigener Forschungsergebnisse die Behauptung aufstellen, dass Ethinylöstradiol hauptsächlich für die Östrogenität im Wasser verantwortlich ist, räumen sie weiterhin eine Mitwirkung durch andere Stoffe ein. So wird z. B. Norethisteron zu Ethinylöstradiol umgewandelt (Kuhnz et al., 1997). Norethisteron ist ein in Kontrazeptiva verwendeter Progesteronmetabolit und scheint so an der Östrogenität im Wasser indirekt beteiligt zu sein. Über die Bedeutung des Progesterons als endokriner Disruptor ist bisher nichts bekannt.

2.1.2 Methoden zur Bestimmung endokriner Aktivität von Chemikalien

Bisher konzentrierte sich die Forschung auf dem Gebiet der Umweltbelastung durch endokrine Disruptoren auf Substanzen mit östrogenen Aktivität, so dass zahlreiche Tests zu ihrem Nachweis entwickelt worden sind. Die Untersuchung von Umweltbelastungen durch Substanzen mit gestagener Wirkung fand dagegen kaum Berücksichtigung. Bei den biologischen Verfahren wird in erster Linie die Qualität der Wirkungseigenschaften getestet. Damit unterscheiden sie sich von physikalisch-chemischen und biochemischen Verfahren, die vor allem die chemische Natur der Substanzen untersuchen (Meyer, 1989, Klinga, 1994).

Biologische in-vivo-Methoden prüfen die Chemikalienwirkung auf den Genitaltrakt oder die Geschlechtsentwicklung bzw. Geschlechtsdifferenzierung im intakten Organismus. Der „ute-

rotrophe“ Test z. B. misst die Zunahme des Uterusgewichts bei kleinen Säugetieren als Zeichen für östrogenen Einfluss. Androgenabhängige Organreaktionen können z. B. anhand von Untersuchungen der Rattenprostata oder des Hahnenkammes festgestellt werden. Bei Reptilien (z. B. Schildkröten) und Amphibien (z. B. Frösche) ist die Geschlechtsdifferenzierung durch Steroide beeinflussbar und kann deshalb als Marker verwendet werden (Gülden et al., 1997, Irwin, 2001, Kloas, 2002, OECD, 2002). Die Vitellogeninsynthese bei Fischen und anderen eierlegenden Wirbeltieren ist eine eindrucksvolle Testmethode. Durch den Nachweis des Dotterproteinvorläufers Vitellogenin im Blut männlicher Fische oder unreifer Fische beiden Geschlechts kann eine östrogene Wirkung erfasst werden (Sumpter und Jobling, 1995, Pickering und Sumpter, 2003). Purdom et al. (1994) zeigen, dass bereits eine Ethinylöstradiol-Konzentration von 0,1 ng/l die Vitellogeninsynthese in Regenbogenforellen induziert. Die Stimulierung der Vitellogeninsynthese ist keine rein östrogenspezifische Wirkung, weil auch Progesteron und Testosteron dieses bewirken können, allerdings erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen (Pelissero et al., 1993). Hooker und Forbes (1949) beschreiben einen biologischen Test zur Gestagenwirkung, bei dem an ovariectomierten Mäusen die Transformation des Endometriums untersucht wird.

Im Gegensatz zu in-vivo-Methoden wird bei in-vitro-Methoden die östrogene Wirkung an isolierten Geweben (Zellen, Zellextrakte, rekombinierte Zellsysteme) getestet. Hierbei wird die Bindung der zu untersuchenden Stoffe an den Östrogenrezeptor vorzugsweise an rezeptorreichen Geweben (z. B. Uterus von Nagetieren, Leber von Forellen) und Zellen (z. B. MCF-7-Zellen) überprüft (Gülden et al., 1997). Der E-Screen-Assay zum Beispiel stellt einen Test zur östrogenabhängigen Zellproliferation dar, bei dem die östrogene Wirkung einer Substanz auf östrogensensitive Brustkrebszelllinien (MCF-7) gemessen wird (Soto et al., 1995). Auch die Stimulierung der Genexpression genetisch veränderter Zellen kann zum Nachweis östrogenener Aktivität herangezogen werden (Fang et al., 2000, Bolz et al., 2002, Kretzschmar et al., 2002). Der Yeast-Assay oder auch Yes-Screen (yeast-based reporter gene assay) weist die östrogene Wirkung von Stoffen durch Genexpression in Hefen nach. Auch androgenabhängige in-vitro-Tests arbeiten mit verschiedenen Zellen und Geweben, insbesondere mit dem Yeast Assay (OECD, 2002).

Der Effekt von Stoffen mit antiöstrogenener Wirkung kann anhand von Rezeptorkonzentrationen sowohl in vivo als auch in vitro erfasst werden (Harper et al., 1994).

Die OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) arbeitet an einem Mindestuntersuchungsprogramm für 3000 Stoffe, die auf hormonwirksame Effekte untersucht werden sollen. Seit Ende der neunziger Jahre besteht die Endocrine Disrupter Activity der OECD mit der Sondereinheit EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment), die sich mit der Entwicklung, dem Vergleich und der Koordination von Testmethoden zur Einschätzung von endokrinen Disruptoren beschäftigt. Es werden Richtlinien erarbeitet und bestehende Testmethoden für die Weiterentwicklung empfohlen (Huet, 2000, OECD, 2002).

2.1.3 Methoden zur Bestimmung der Konzentration endokriner Disruptoren

Neben den qualitativen Methoden zur Untersuchung endokriner Aktivität von chemischen Stoffen in der Umwelt spielt auch die quantitative Bestimmung eine entscheidende Rolle.

Für die Identifizierung und Messung der Hormonkonzentrationen in verschiedenen Matrices eignen sich physikalisch-chemische Verfahren. Weit verbreitet sind inzwischen immunologische Tests, die ausgehend von aufwendigen Radioimmunassays (RIA) zu einfach durchführbaren Enzymimmunassays (EIA) weiterentwickelt wurden (Meyer, 1989).

Die Bestimmung von Östrogenen im Organismus kann mittels Kolorimetrie, Fluorimetrie, Massenspektrometrie oder Gaschromatographie und von Progesteron mittels UV-Spektroskopie oder Gaschromatographie erfolgen, wobei Blut oder Urin verwendet werden. Daneben sind insbesondere immunologische Verfahren wie EIA, RIA, Lumineszenzassay oder Fluoreszenzimmunoassay für die Östrogen- und Progesteronbestimmung geeignet, wobei der EIA die größte Bedeutung hat (Klinga, 1994).

Für die Fortpflanzungsdiagnostik in der Tierzucht wurden inzwischen Progesterontests entwickelt, die eine Blutabnahme zur Hormonanalyse überflüssig machen. Es eignen sich Milch, Urin und Kot für die Progesteronanalyse (Hoffmann und Hamburger, 1973, Desaulniers et al., 1989, Palme et al., 1991). Die Bestimmung der Hormone im Kot ist allerdings auf Speziallabors beschränkt und wird hauptsächlich bei Wild- und Zootieren durchgeführt (Neumann et al., 2002, Aurich, 2002). EIA-Schnelltests zur Progesteronbestimmung in der Milch sind heute eine gängige Untersuchungsmethode zur Trächtigkeitsdiagnostik und Bestimmung des Besamungszeitpunktes in der Rinderzucht (McMaughey und Cooper, 1980, Foulkes und Goodey, 1988, Palme et al., 1991, Sobiraj et al., 1995). Die Zyklusbestimmung beim Kleintier erfordert noch Blutproben, die mittels EIA-Schnelltests untersucht werden können (Hospes et al., 1999).

Bei Messungen zur Bestimmung von Hormonkonzentrationen im Wasser eignen sich die Gas- und Massenspektrometrie, die den Nachweis von bis zu 1 ng/l des zu messenden Hormons ermöglichen (Bolz et al., 2002). Auch Kopplungen von Flüssigchromatographie und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie oder Tandem-Massenspektrometrie werden häufig für analytische Messungen von Hormonen und endokrin wirksamen Stoffen verwendet. Sensibler und auch preisgünstiger sind Immunassays. Besonders der ELISA (enzyme-linked immunosorbend assay) eignet sich für die Untersuchung von Stoffkonzentrationen in Wasserproben (Schmid und Frühauf, 1998, Huang und Sedlak, 2001). Mit Hilfe verschiedener Tests weisen Kolpin et al. (2002) Hormone in Flusswasserproben von 139 Flüssen in den USA nach. Neben Bisphenol-A, Östradiol und Testosteron konnte auch Progesteron in 4,3 % der Proben mit einer mittleren Konzentration von 0,11 g/l nachgewiesen werden.

2.2 Progesteron

Progesteron ist der wichtigste Vertreter der natürlichen Gestagene, welche endogen im Säugetierorganismus gebildet werden und besonders für die Erhaltung der Schwangerschaft von Bedeutung sind. Gestagene gehören neben Östrogenen und Androgenen zu den Steroidhormonen. Die gemeinsame Struktur der Steroide ist das Gonan-Grundgerüst, eine Verbindung von drei Sechseringen mit einem Fünfering (Bamberg, 1994).

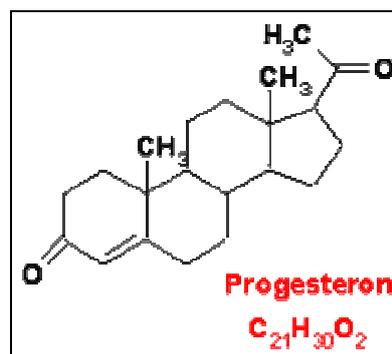


Abbildung 1: Das Progesteronmolekül (4-Pregnen-3,20-dion)

Progesteron ist ein C₂₁-Steroid. In diese Gruppe gehören auch die Corticosteroide. Die männlichen Geschlechtshormone (Androgene) sind C₁₉-Steroide, während Östrogene zu den C₁₈-Steroiden gehören (Aurich, 2002). Weitere Vertreter der ca. 40 verschiedenen natürlichen Gestagene sind (neben Progesteron) 17 α -Hydroxyprogesteron und 20 α -Dihydroprogesteron (Rabe und Runnebaum, 1994).

2.2.1 Biosynthese und Rezeptorbindung

Cholesterol stellt die Muttersubstanz aller Steroide dar. Es entsteht vor allem in der Leber, aber auch in der Darmschleimhaut, in der Nebennierenrinde und in den Gonaden aus Acetyl-Co A. Die Progesteron-Biosynthese verläuft vom Cholesterol aus über Pregnenolon zum Progesteron (Träger, 1977, Silbernagl und Despopoulos, 1991, Bamberg, 1994). Gonadoliberine des Hypothalamus stimulieren den Hypophysenvorderlappen, der daraufhin Lutropin und Follitropin freisetzt, die ihrerseits die Ausschüttung von Progesteron (und Östrogenen) steuern (Schallenberger und Prokopp, 1985, Frimmer, 1986). Eine Ausnahme ist das Kaninchen, bei dem Östrogene luteotrop (auf den Gelbkörper gerichtet) wirken (Frimmer, 1986). Die Bildung des Progesterons und seiner Metabolite erfolgt im Ovar in der Granulosazellschicht des ovulationsbereiten Tertiärfollikels und in den Lutealzellen des Gelbkörpers (Corpus luteum) sowie in der Plazenta (Döcke, 1994). Progesteron wird außerdem als Zwischenstufe der Cortisolproduktion in der Nebennierenrinde, der Androgensynthese im Hoden, sowie bei der Östrogenbiosynthese im Ovar produziert (Faber und Haid, 1995). Die Sekretion von Progesteron beträgt bei der Frau in der präovulatorischen Phase 2-3 mg pro Tag, in der Gelbkörperphase bis zu 30 mg pro Tag und in der späten Schwangerschaft ca. 320 mg pro Tag. Beim Mann liegt die Sekretionsrate bei ca. 0,7 mg pro Tag (Wyss, 1970, Silbernagl und Despopoulos 1991, Rabe und Runnebaum, 1994).

Während der Zirkulation im Blut wird Progesteron an die Serumproteine Albumin und Transcortin gebunden. Proteingebundene Steroidhormone bilden den Hormonpool und haben damit auch eine Pufferfunktion für die Aufrechterhaltung von Hormonkonzentrationen im Blut. Für die Aufnahme in die Zielzellen muss gebundenes Hormon wieder freigesetzt werden (Bamberg, 1994).

Progesteron gelangt aufgrund der guten Lipidlöslichkeit per Diffusion in die Zielzelle. Dort bindet es an spezifische Rezeptoren, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Wirkung von Progesteron ist östrogenabhängig (Döcke, 1994). Nach zeit-, temperatur- und kalziumabhän-

giger Aktivierung und damit verbundener Konformations- und Größenänderung gelangt der Progesteron-Rezeptor-Komplex durch passive Diffusion in den Zellkern. Er aktiviert dort spezifische Gene. Erst nach etwa 18 bis 24 Stunden sind die Stimulation der DNS-Synthese und die Zellproliferation erkennbar (Träger, 1977, Bamberg, 1994).

Die Wirkung von Progesteron bezieht sich auf nahezu alle weiblichen Reproduktionsvorgänge. Gestagene Wirkungen werden im Zusammenspiel mit Östrogenen vermittelt (Neumann et al., 1996). In Bezug auf die einzelnen Gewebe hebt Progesteron in den meisten Fällen die Östrogenwirkung auf. Es verstärkt jedoch den wachstumsfördernden Effekt der Östrogene im Myometrium während der Trächtigkeit, erhöht das Ruhepotenzial der Zellmembrane und verringert damit die Kontraktilität des Myometriums. Weiterhin bewirkt es die Umwandlung von proliferativem zu sekretorischem Endometrium und ermöglicht damit die Ernährung der freien Blastozyste und ihre Implantation. An der Zervix verursacht Progesteron eine für Spermien undurchdringbare Konsistenz des Schleimpfropfes. Außerdem fördert Progesteron die Entwicklung des Milchgangsystems und steigert den allgemeinen Energiestoffwechsel (Döcke, 1994, Rabe und Runnebaum, 1994).

Neben Progesteron selbst findet man auch Progesteronmetabolite, die gestagene Wirkung haben. In der Plazenta der Frau konnten die Progesteronmetabolite 3β -OH- 5α -Pregnan-20-on, 5α -Pregnane- 3β , 20α -diol, Pregnandiol, 3β -OH- 5β -Pregnan-20-on, Pregnenolon, 20β -OH-Progesteron und 20α -OH-Progesteron nachgewiesen werden (Wyss, 1970). Im Hühnerovidukt zeigt 5α -Pregnan-3,20-dion die gleiche Aktivität zur Avidin-Induktion wie Progesteron (Träger, 1977). Bei der Ratte werden 5α -Pregnan-3,20-dion und 3α -Hydroxy- 5α -pregnan-20-on im Bereich von Hypophyse und Hypothalamus gefunden, die dort vermutlich eine wichtige Funktion bei der Steuerung Progesteron-sensibler Prozesse haben (Karavolas et al., 1976).

2.2.2 Metabolisierung und Ausscheidung

Progesteron wird größtenteils im Körper zu verschiedenen 5α - und 5β -reduzierten Pregnandiols, Pregnanolons und Pregnandiols metabolisiert (Schwarzenberger et al., 1996a).

Die Hauptausscheidung des Progesterons erfolgt mit dem Kot und dem Harn und unterliegt wie die Steroidsynthese einem tageszeitlichen Rhythmus (Träger, 1977). Um die lipophilen Progesteronmetabolite mit dem Harn auszuschcheiden, werden Glukuron- oder Schwefelsäure an das Ringsystem konjugiert. Dieser Vorgang geschieht beim Progesteron hauptsächlich in der Leber, aber auch in der Niere, der Lunge, den Gonaden, anderen Geweben sowie im Blut

(Groh et al., 1993, Bamberg, 1994). Pregnandiol (5β -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol) steht mengenmäßig an der Spitze der Progesteronmetabolite, die mit dem Urin ausgeschieden werden. Es ist der wichtigste Progesteronmetabolit und wird als Glukuronid eliminiert. Während der Lutealphase scheiden Frauen 2 bis 3 mg pro Tag aus, im letzten Schwangerschaftsdrittel sind es bis zu 85 mg pro Tag (Wyss, 1970, Träger, 1977). Außerdem konnten Progesteron, 15α -OH-Progesteron, 16α -OH-Progesteron, Pregnanolon, Pregnantriol und andere Progesteronmetabolite im Urin nachgewiesen werden. Männliche Säugetiere bilden ebenfalls bedeutende Mengen an Progesteronmetaboliten, während beim Mann nur Spuren davon entstehen (Träger, 1977, Wyss, 1970). Für die Harnausscheidung beim Rind benennt Döcke (1994) Pregnandiol, 5α -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol und 5β -Pregnan- $3\beta,20\beta$ -diol und beim Schwein 5β -Pregnan- 3α -ol-20-on, Pregnandiol und 5β -Pregnan- $3\alpha,6\alpha$ -diol-20-on als Hauptmetabolite.

Die mit dem Kot ausgeschiedenen Progesteronmetabolite sind in der Regel nicht konjugiert (Karg, 1994, Schwarzenberger et al., 1996a, Larsson et al., 1999). In diesem Zusammenhang wird von spezifischen obligat anaeroben Bakterien der Darmflora berichtet, die in der Lage sind, zuvor konjugierte Steroidhormone durch Reduktion oder Seitenkettenspaltung zu dekonjugieren, so dass im Kot nicht-konjugierte Formen nachweisbar sind. Die Metabolisierung und Ausscheidung ist qualitativ und quantitativ stark speziesabhängig (Groh et al., 1993, Bamberg, 1994). In Untersuchungen zur endokrinologischen Funktion von Wildtieren wurden 20α -OH-Progesteronmetabolite z. B. mit Hilfe eines gruppenspezifischen Antikörpers gegen Pregnandiol bzw. gegen 4-Pregnen- $3,20$ -dion (Progesteron) im Kot bestimmt (Schwarzenberger et al., 1993a, Shaw et al., 1995, Blanvillain et al., 1996). Beim Spitzmaulnashorn erreichten die Pregnandiolwerte ab dem 100. Trächtigkeitstag 2000 ng/g Kot und ab dem 200. Trächtigkeitstag sogar 4000 ng/g Kot. Beim Vikunja wurden Progesteronmetabolite der 20-oxo- oder 20α -OH-Gruppe mit mehr als 100 ng/g Kot gemessen (Schwarzenberger et al., 1995). Beim Okapi ziehen Schwarzenberger et al. (1993b) die Konzentration von 4-Pregnen- 20β -ol-3-on (20β -OH-Progesteronmetabolite) heran. Beim Afrikanischen Elefanten werden 5α -Pregnan- 3α -ol-20-on und 5α -Pregnan- 3β -ol-20-on als Hauptmetabolite der Kotausscheidung ermittelt (Wasser et al., 1996). Herold (1997) diente 4-Pregnen- $3,20$ -dion als Repräsentant der Gestagene im Kot bei hirschartigen Tieren und beim Okapi. Zusammenfassend sind die am meisten im Kot ausgeschiedenen Progesteronmetabolite die 20α -OH-, die 20β -OH- und die 20-oxo-Metabolite (Rabiee et al., 2001, Rabiee et al., 2002) sowie die 20-keto-Metabolite (Schwarzenberger et al., 1993a, Schwarzenberger et al., 1996b). Offensichtlich eignet sich eine Vielzahl von Progesteronmetaboliten im Kot zur Untersuchung der Fortpflanzungsfähigkeit bei solchen Säugetieren, bei denen invasive Techniken kaum durchführbar sind. Da die

im jeweiligen EIA verwendeten Antikörper in der Regel Kreuzreaktivitäten mit mehreren Progesteronmetaboliten aufweisen, wird bei diesen Untersuchungen eine Vielzahl der Metabolite erfasst.

Die Ausscheidung von Steroidhormonen über die Milchdrüse ist mengenmäßig weniger bedeutsam. Nur 0,06-0,25 % des Progesterons werden beim Rind mit der Milch ausgeschieden (Lange et al., 2002). Auch im Speichel sind Steroide in geringen Konzentrationen messbar (Palme et al., 1991).

Bei einem erwachsenen weiblichen Rind beträgt die jährlich ausgeschiedene Menge der Gestagene 3200 mg, bei einem trächtigen Rind 4400 mg. Ein erwachsenes weibliches Schwein scheidet 1700 mg pro Jahr aus und ein trächtiges Schwein 3900 mg. Für ein weibliches geschlechtsreifes Schaf wurde eine jährliche Ausscheidung von 730 mg ermittelt, während ein trächtiges Schaf 850 mg pro Jahr ausscheidet. Insgesamt werden in der Europäischen Union jährlichen 322 t Gestagene von landwirtschaftlichen Nutztieren ausgeschieden (Lange et al., 2002). Die mengenmäßige Verteilung der ausgeschiedenen Progesteronmetabolite auf Kot oder Harn ist ebenfalls tierartlich verschieden (Wasser et al., 1996, Heistermann et al., 1998).

2.2.3 Synthetische Gestagene

Für die medizinische Verwendung von Progesteron wurden synthetische Gestagene entwickelt, die nach oraler Aufnahme eine bessere Verfügbarkeit im Organismus aufweisen und deren Wirksamkeit stabiler und länger anhaltend ist als bei dem natürlichen Vertreter. Die synthetischen Gestagene werden unterteilt in die Derivate des Progesterons und Derivate des 19-Nortestosterons. Ihre gemeinsame Eigenschaft ist die Affinität zu den spezifischen Progesteronrezeptoren im Zytoplasma. Wichtige synthetische Progesteronabkömmlinge sind unter anderem Chlormadinonacetat und Medroxyprogesteronacetat (Rabe et al., 1994, Kuhl und Jung-Hoffmann, 1999).

In der Veterinärmedizin werden synthetische Progesteronverbindungen in erster Linie zur Östrussynchronisation und Zyklussteuerung bei Rindern, Pferden, Schafen, Ziegen und Schweinen angewendet, wobei für Lebensmittel liefernde Tiere besondere gesetzliche Einschränkungen gelten (Löscher et al., 2003). Hunde und Katzen werden zur Verhinderung des Östrus mit Progesteron-Verbindungen behandelt. Bei Katzen scheint eine Therapie mit Gestagenen bei eosinophilem Granulom und miliarer Dermatitis wirksam zu sein. Verhaltens-

probleme beim Hund stellen z. T. auch ein Indikationsgebiet dar. Prostatahypertrophie, Prostatakarzinome und Perianaltumoren können ebenfalls mit ausgewählten Verbindungen therapiert werden (Bishop, 2001). In der Veterinärmedizin werden unter anderem Chlormadinonacetat, Proligeston, Medroxyprogesteronacetat und Melengestrolacetat als synthetische Progesteronabkömmlinge therapeutisch eingesetzt (Busch, 1994, Kroker, 2002, Aurich, 2002).

Die Anwendung natürlicher und synthetischer steroidaler Sexualhormone bei Lebensmittel liefernden Tieren unterliegt in Deutschland strikten gesetzlichen Einschränkungen. Die Verabreichung von anabol wirkenden Sexualhormonen zur Verbesserung der Mastleistung ist in Deutschland generell verboten. Progesteron ist bei Lebensmittel liefernden Tieren für die intravaginale, therapeutische oder tierzüchterische Verwendung in Übereinstimmung mit der Richtlinie 96/22/EWG zugelassen, weil es in den Anhang II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates „zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs“ aufgenommen wurde. Damit ist z. B. auch das Anwendungsverbot von Vaginalspiralen vom 1. Januar 2000 wieder aufgehoben (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 1996, Ungemach, 2003).

In der Humanmedizin ist die Anwendung synthetischer Gestagene für ein umfangreiches Indikationsgebiet möglich. Dazu gehören unter anderem Zyklusstörungen, krankhafte Veränderungen der Gebärmutter einschließlich metastasierender Karzinome und Veränderungen der Brustdrüse sowie Akne und Prostatahyperplasie (Ammon, 1995, Neumann et al., 1996).

2.3 Eintragspfade von Progesteron ins Oberflächenwasser

Natürliche Hormone gelangen kontinuierlich durch Ausscheidungen von Menschen und Tieren in die Umwelt (Nghiem et al., 2004, Ying et al., 2002). Untersuchungen zum Eintrag von Sexualhormonen in die Umwelt beschränkten sich bislang auf natürliche und synthetische Östrogene (Baronti et al., 2000). Die Eintragspfade dürften aber auch für Gestagene gelten.

2.3.1 Menschliche Ausscheidungen

Die vom menschlichen Organismus mit Kot und Harn ausgeschiedenen natürlichen und synthetischen Steroidhormone werden in der Regel über kommunale Abwasserleitungssysteme der Abwasserreinigung in Kläranlagen zugeführt (Sattelberger, 1999, Herbst, 2000). Von dort gelangen sie mit dem gereinigten Abwasser in die aufnehmenden Flüsse (Vorfluter), da keine vollständige Elimination im Klärwerk stattfindet (Desbrow et al., 1998, Baronti et al., 2000). In Bereichen landwirtschaftlicher Streusiedlungen geht das Abwasser einen anderen Weg. Hier kommen vielfach Einzelkläranlagen zum Einsatz. Die Versickerung des gereinigten Abwassers erfolgt in den Untergrund, wenn keine Vorflut vorhanden ist (Hessische Landesanstalt für Umwelt, 1997) und stellt somit hauptsächlich eine Boden- und Grundwasserbelastung dar. Nach intensivem Regen ist durch Abschwemmung auch eine direkte Belastung des Oberflächenwassers zu erwarten (Ternes et al., 2003b).

Im Hinblick auf die Hormonbelastung der Umwelt ist die landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm von besonderer Bedeutung. An den Klärschlamm adsorbierte Rückstände aus der Abwasserreinigung dringen besonders bei Regen in die Böden ein und können mit dem Sickerwasser oder über das Grundwasser in die Oberflächengewässer gelangen (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 2000, Ternes et al., 1999a). Allein in Brandenburg werden jährlich 30.000 t Klärschlamm auf die Böden aufgebracht (Landesumweltamt Brandenburg, 2000).

2.3.2 Tierische Ausscheidungen

Mit den Exkrementen von Nutztieren ausgeschiedene natürliche und synthetische Sexualhormone werden in der Regel mit dem Dung oder der Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht. Der Eintrag von tierischen Ausscheidungen in die Umwelt erfolgt auf direktem Weg und nicht über Kläranlagen (Schlenker et al., 1999a). Wie bei der Ausbringung von Klärschlamm auf die Böden ist schwerpunktmäßig zunächst eine Boden- und Grundwasserbelastung zu erwarten, die sich durch Abschwemmung auf die Oberflächengewässer ausdehnen kann (Ternes et al., 2003b). Nach Welte und Timmermann (1982) führt der hohe Anfall tierischer Abprodukte (Gülle, Jauche) durch Massentierhaltungen zu einer erheblichen Belastung der Gewässer. Schlenker et al. (1998a) weisen nach, dass die Lagerung von Rinderkot über 12 Wochen zu einer Abnahme der Progesteronkonzentration im Kot um 90 %

fürte. Sie können so die Vermutung von Möstl et al. (1997), dass der Östrogeneintrag in die Umwelt bei Ausbringung von frischem Kot höher ist als bei Ausbringung von gelagertem Dung, auch für Progesteron bestätigen. Weitere Untersuchungen ergeben eine deutlich langsamere Abnahme der Progesteronkonzentration im Kot bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C als bei 30 °C (Schlenker et al., 1999a).

2.4 Abbau von Steroidhormonen im Klärwerk

2.4.1 Reinigungsstufen im Klärwerk

Häusliche Abwässer werden in der Regel in Kläranlagen gereinigt. Man unterscheidet kommunale Kläranlagen und Kleinkläranlagen bzw. Einzelkläranlagen.

Im Klärwerk wird Abwasser in drei Reinigungsstufen behandelt, bevor es als gereinigtes Abwasser in angrenzende Oberflächengewässer geleitet wird. Die Reinigungsstufen sind:

- (1) Mechanische Reinigung: Grobe Abwässerunreinigungen und Sand sowie kleinere Sinkstoffe werden eliminiert. Schwimmfähige Teilchen sammeln sich an der Wasseroberfläche und werden mittels Leichtstoffabscheidern oder Öl- und Fettabscheidern geräumt. Im Vorklärbecken setzen sich anschließend durch Verminderung der Fließgeschwindigkeit Schlammteilchen am Boden ab. Der Schlamm wird entweder ausgeräumt oder verbleibt bis zur Ausfäulung (Daubner, 1984).
- (2) Biologische Reinigung: Im Belebungsbecken werden die Vorgänge der biologischen Selbstreinigung in Gewässern nachgeahmt (Herbst, 2000). Durch mikrobielle Stoffwechselvorgänge und Adsorption an Belebtschlammflocken entstehen anorganische Verbindungen und Biomasse. Im Nachklärbecken wird der Überschussschlamm, der aus abgestorbenen Mikroorganismen und abgebauten Stoffen besteht, vom Abwasser getrennt (Böhnke, 1994, Thiersch, 2001).
- (3) Weitergehende Reinigung: Als ergänzende Reinigungsschritte für starke Verschmutzungen können Mikrofiltration, Phosphatfällung, Ozonierung und Umkehr-Osmose eingesetzt werden. Neben problematischen Stoffen wie Stickstoff- und gelösten Phosphorverbindungen sollen schwer abbaubare Stoffe wie Hormone, Schwermetalle und Salze eliminiert werden (Wagner, 1995, Schwarz, 2003, Ternes et al., 2003a).

Von besonderer Bedeutung für den Abbau von organischen Stoffen ist das Belebungsbecken, in dem die Biomasse ihre biologische Reinigungsleistung entfaltet. Im Belebungsbecken einer Kläranlage bildet sich dieser Belebtschlamm aus ein- und mehrzelligen Organismen. Durch Haftung der Mikroorganismen aneinander entstehen Belebtschlammflocken (Hänel, 1986). Die Biozönose setzt sich aus Gram-negativen Bakterien (z. B. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*), Gram-positiven Bakterien (z. B. *Corynebakterium*, *Bacillus*), Protozoen (z. B. Flagellaten, Amöben, Ciliaten), mehrzelligen Organismen (z. B. Rotatorien und Nematoden) sowie Algen und Pilzen zusammen (Thomanetz, 1982, Daubner, 1984, Hänel, 1986).

Bei einer Temperatur von 1 °C bis 22 °C beruht die Abwasserreinigungsleistung dieser Flocken im Belebungsbecken bzw. das „Belebtschlammverfahren“ auf der Umwandlung organischer in mineralische Stoffe. Außerdem finden Stoffumwandlungsvorgänge wie Nitrifikation (Oxidation von Ammonium zu Nitrit und/oder Nitrat) und Denitrifikation (Reduktion von Nitrit und/oder Nitrat zu gasförmigem Stickstoff) sowie einfache Adsorption bestimmter Stoffe an den Belebtschlamm statt. Adsorbierte Stoffe werden durch den Abzug des Überschussschlammes aus dem Abwasser eliminiert (Hänel, 1986).

Die Temperatur hat wesentliche Auswirkungen auf die Lebensgemeinschaften der Belebtschlammorganismen. Bei einem Temperaturanstieg von 10 °C erhöht sich die Atmungsgeschwindigkeit der Mikroflora und somit die mikrobielle Tätigkeit um das 2- bis 3-fache (Daubner, 1984, Hänel, 1986). Zusätzlich kommt es temperaturabhängig zu einem bakteriellen Populationszuwachs bei höheren Temperaturen, z. B. im Sommer (Saleem et al., 2003).

2.4.2 Abbau von Steroidhormonen

Steroidhormone werden von Menschen und Tieren zu einem großen Teil in konjugierter Form ausgeschieden. Das Vorkommen von nicht konjugierten Steroidhormonen in Kläranlagenabläufen und Flüssen (Desbrow et al., 1998, Belfroid et al., 1999, Ternes et al., 1999a) wird als ein Zeichen dafür angesehen, dass auf dem Weg zwischen Haushalt und Kläranlagenabfluss eine Dekonjugation und damit Reaktivierung der biologischen Wirksamkeit erfolgt (Larsson et al., 1999, Panter et al., 1999, Ternes et al., 1999b, D'Ascenzo et al., 2003). Durch mikrobielle Aktivität werden unwirksame konjugierte Substanzen so in wirksame transformiert (Baronti et al., 2000). Dray et al. ziehen bereits 1972 *Escherichia coli* für die Spaltung von Glukuronidbindungen in Betracht, da es das Enzym β -Glukuronidase synthetisiert und durch

Ausscheidung mit dem Kot vermehrt im Abwasser vorkommt (Desbrow et al., 1998). Den Einfluss von Mikroorganismen auf Steroidhormonmetabolite konnten auch Bokkenheuser et al. (1981) nachweisen. In Versuchen mit Faecalflora von Menschen und Ratten bewiesen sie die Dehydroxylierung von 16α -Hydroxyprogesteron durch die Mikroorganismen.

Das Ziel der biologischen Abwasserreinigung besteht darin, ein fast substratfreies Abwasser zu erzeugen. Belebtschlammorganismen sollen alle als Nahrung verwertbaren Substrate aufnehmen (Hänel, 1986). Für Steroidhormone im Abwasser wird eine Biodegradation angestrebt, also ein Abbau von Substanzen durch Mikroorganismen oder deren Enzyme (Agteren et al., 1998). In Japan konnte ein einzelnes Bakterium im Belebtschlamm isoliert werden, welches Östron, 17β -Östradiol und Östriol biodegradiert. Es handelte sich dabei um eine bislang unbekannte *Novosphingobium*-Spezies (Fujii et al., 2002). Einige Pilzarten wie *Thamnostylum piriforme*, *Mucor griseocyanus*, *Actinomucor elegans* und *Zyodesmus spp.* sind in der Lage, Progesteron sowie einige seiner Metabolite zu hydroxylieren (Hu et al., 1995).

Für ausgewählte Östrogene konnten auch nach der biologischen Abwasserreinigung beachtliche Konzentrationen in Kläranlagenabläufen nachgewiesen werden. Für Östron wurden bis zu 80 ng/l (Desbrow et al., 1998, Wegener, 1999) und für 17β -Östradiol bis zu 50 ng/l gemessen (Stumpf et al., 1996, Desbrow et al., 1998). Shore et al. (1993) konnten in Israel höhere Östrogenkonzentrationen in Abläufen von Klärwerken messen, die Abwasser aus Farmgebieten bezogen, als dort, wo das Abwasser aus städtischen Regionen kam. Im Sommer waren die Östrogenkonzentrationen deutlich höher als im Winter.

Einige Autoren führten Messungen zur Reduktion von Östrogenen in Klärwerken durch. Baronti et al. (2000) und Petrovic et al. (2000) konnten Eliminierungsraten für Östradiol von 87 % bzw. 100 % und für Östron von 61 % bzw. 85 % nachweisen. Einen bedeutenden Einfluss auf die Eliminierungsraten von Steroidhormonen hat nach Kirk et al. (2002) und Bursch et al. (2004) die Retentionszeit im Belebungsbecken. Nach einer Belüftungszeit von 6-8 Stunden (Hänel, 1986) bzw. 10-14 Stunden (Johnson et al., 2000) gilt die biologische Reinigung als abgeschlossen, wobei ein effektiver Abbau von organischen Substanzen längere Retentionszeiten erfordert (Ternes et al., 1999b). Für verschiedene endokrine Disruptoren konnten Bursch et al. (2004) eine positive Korrelation zwischen Elimination der Stoffe und der Retentionszeit des Belebtschlammes im Belebungsbecken ermitteln.

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass natürliche Östrogene im Klärwerk schneller und vollständiger abgebaut werden als synthetische. Diese größere Stabilität der synthetischen Derivate ist höchstwahrscheinlich auch für die höhere Persistenz dieser Stoffe in der Umwelt verantwortlich (Lange et al., 2002). Beim Vergleich der Stabilität synthetischer Gestagene

gegenüber synthetischen Östrogenen in Belebtschlammversuchen ermittelten Norpoth et al. (1973) eine deutlich höhere Stabilität des synthetischen Östrogens Ethinylöstradiol gegenüber den chemisch labileren synthetischen Gestagenen (z. B. Medroxyprogesteronacetat und Chlormadinonacetat). Medroxyprogesteronacetat war nach 120 Stunden und Chlormadinonacetat schon nach 36 Stunden nicht mehr nachweisbar, während Ethinylöstradiol auch nach 120 Stunden noch zu 100 % vorlag. In Versuchen mit optimierten Belebtschlammkulturen dauerte es insgesamt 3-4 Wochen, bis natürliche und synthetische Östrogene vollständig abgebaut waren (Tabak und Bunch, 1970). Untersuchungen zum Östronabbau im Aqua bidest. mit Zusatz von Belebtschlamm bzw. im Flusswasser mit Belebtschlammzusatz ergaben eine Abbaurrate von 90 % innerhalb von 4 bis 8 Tagen bzw. in weniger als 4 Tagen (Giese, 2004). Radiomarkiertes 17β -Östradiol wurde im Abwasser innerhalb von 24 Stunden zu 75 % abgebaut, während radiomarkiertes synthetisches 17α -Ethinylöstradiol nur zu 20 % abgebaut wurde (Layton et al., 2000). Wegener et al. (1999) führten Versuche zum Abbau von 17β -Östradiol durch, welches sie in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ sowie 100 ng/l Wasserproben aus einem Kläranlagenablauf zusetzten. Nach 7 bis 8 Tagen bei 20 °C und Dunkelheit war 17β -Östradiol vollständig abgebaut.

Mikroorganismen nutzen die Steroide als Kohlenstoffquelle. Die Belebtschlammflora passt sich bezüglich der Abbauleistung an die Inhaltsstoffe des Abwassers an, denn die Biomasse von kommunalem Abwasser baut die (radiomarkierten) Steroide 17α -Ethinylöstradiol und 17β -Östradiol besser ab als Biomasse aus industriellem Abwasser. Auch Testosteron wurde innerhalb von 24 Stunden zu 55 % bis 65 % in kommunalem Abwasser abgebaut. Auf die Abbaugeschwindigkeit von Steroidhormonen hat auch die Temperatur einen Einfluss. Bei einer Temperatur von 22-25 °C erfolgt ein schnellerer Abbau von 17β -Östradiol als bei 5-10 °C (Layton et al., 2000).

Eine Elimination von Steroidhormonen aus dem Abwasser kann nicht nur durch mikrobielle Abbauprozesse erfolgen, sondern auch durch Adsorption an die Biomasse. So entgeht ein Teil der Hormone der Degradation und wird mit dem Überschussschlamm aus dem Abwasser eliminiert. Sedlak et al. (2000) schätzen, dass sogar 90 % der Hormone an Schlammpartikel adsorbiert werden. Layton et al. (2000) ermitteln eine 90-prozentige Elimination von radiomarkiertem 17β -Östradiol aus dem Abwasser durch Biodegradation (70-80 %) und Adsorption an Zellmasse. Schäfer et al. (2003) und Nghiem et al. (2004) berichten von Untersuchungen zur Elimination von Hormonen aus dem Wasser mittels nanofiltrierender Membranen. Sie kommen zu der Erkenntnis, dass der dominierende Mechanismus bei dieser Methode die Adsorption der Hormone an die Membran ist. Bislang gibt es jedoch keine standardmäßig eingesetz-

ten Filtersysteme (z. B. Membranfiltertechniken) in der Abwasserreinigung oder Trinkwasserherstellung, die Hormone und andere Substanzen mit ähnlich kleinen Molekülgrößen aus dem Abwasser oder Trinkwasser eliminieren. Auch chemische Methoden (z. B. Ozonierung) haben sich noch nicht standardmäßig durchgesetzt. Für die Biotechnologie von Interesse ist die Möglichkeit, mit Hilfe von Plasmiden erwünschte Gene in andere Organismen zu übertragen. So könnten für die Abwasserreinigung besonders geeignete Mikroorganismen erzeugt werden (Rheinheimer, 1991).

Zum Abbau von Progesteron im Klärwerk liegen bisher keine Angaben vor.

2.5 Abbau von Steroidhormonen im Oberflächenwasser

2.5.1 Reinigungsvorgänge im Oberflächenwasser

Oberflächenwasser ist im Allgemeinen das Wasser der natürlichen oder künstlichen oberirdischen Gewässer (z. B. Flüsse, Seen, Talsperren) (DIN 4046). Damit ist es ein Gemisch aus Grundwasser, Quellwasser, Regenwasser und Abwasser (Brockhaus, 1996, Ternes et al., 1999a, Sumpster, 1998). Oberflächenwasser ist häufig Rohstoff für die Trinkwassergewinnung. In dicht besiedelten Gebieten kann der Abwasseranteil im Flusswasser ca. 50 % betragen (Sumpster, 1998). Regenarme Zeiten führen teilweise zu einem Anstieg des Abwasseranteils auf über 90 %, besonders in kleineren Flüssen (Routledge et al., 1998).

Die Bakterienflora der Gewässer ist sehr vielfältig und je nach Art des Gewässers unterschiedlich. Neben den autochtonen Wasserbakterien (sogenannte echte Wasserbakterien), die sich nur im Wasser optimal entwickeln können, kommen auch zymogene Bakterien aus anderen Biotopen, z. B. dem Erdboden, vor. Die meisten Gewässerbakterien sind C-heterotrophe Organismen, die sich von organischen Stoffen ernähren und in der Regel in der Lage sind, sehr geringe Nährstoffkonzentrationen auszunutzen. Häufig in Flüssen vorkommende Mikroorganismen sind *Cytophagen*, *Micrococcen*, *Nocardien*, *Sarcinen*, *Spirillen*, *Spirochaeten*, *Streptomyces* und *Thiobacillen*. Abhängig von der Abwasserbelastung der Gewässer kommen auch *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus vulgaris* und *Clostridien* vor. Neben den Bakterien spielen auch Blaualgen, Pilze sowie Viren und Plasmide eine Rolle im Zusammenspiel der Mikroorganismen der Gewässer. Die Belastung mit organischen Substanzen führt in Gewässern zur Aktivierung und Vermehrung von Mikroorganismen mit abbauenden Eigenschaften.

Der Abbau von organischem Material dient dem Aufbau mikrobiologischer Substanz und der Energiegewinnung für Mikroorganismen (Rheinheimer, 1991). In Seen mit geringem Nährstoffangebot stellen die oligocarbophilen Bakterien (z. B. *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) eine verhältnismäßig große Fraktion der Bakterienpopulation dar. Diese Organismengruppen vermögen aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung den schwer mineralisierbaren Anteil der organischen Bestandteile verhältnismäßig schnell zu mineralisieren (Moalej, 1978, 1980). Für oligotrophe marine Gewässer stellen *Pseudomonaden* den Hauptanteil der Bakterienflora dar, dagegen sind in belasteten Bereichen häufiger Organismen der Gattung *Vibrio* vertreten (Akagi et al., 1980).

Auch Vertreter der Gattung *Aeromonas spp.* werden heute als typische Zeiger organischer Belastungen aufgefasst. Ihr Anteil an der Bakterienflora nahm in Fließgewässern durch Zufuhr organischer Verbindungen deutlich zu (Schubert, 1975, Rippey und Cabelli, 1980, Kaper et al., 1981). Anders als bei der Abwasserbehandlung mit Belebtschlamm ist im Oberflächenwasser nur mit einer geringen Adsorption organischer Substanz an Partikel zu rechnen (Sedlak et al., 2000).

Die Aktivierung bakteriell-enzymatischer Vorgänge zur Selbstreinigung wird durch den BSB₅-Wert charakterisiert. Der BSB₅ ist der biologische Sauerstoffbedarf, den Mikroorganismen im Verlauf von 5 Tagen bei 20 °C im Dunkeln haben. Liegt er unter 20 mg/l, ist eine Selbstreinigung des Gewässers bis zur ursprünglichen Qualität möglich (Müller und Schlenker, 2004).

Die Anzahl der Bakterien im Oberflächenwasser ist sehr unterschiedlich. In sauberen Gewässern weist Rheinheimer (1991) eine Koloniezahl von $0,026 \cdot 10^9/l$ Wasser bzw. $0,278 \cdot 10^9/l$ Wasser nach, in verschmutzten $10,064 \cdot 10^9/l$ Wasser. Herbst (2000) misst an zwei Flüssen in Deutschland Koloniezahlen in der Größenordnung $10^6/l$ Wasser. In Flüssen sind die Keimzahlen durch eine ständige Zufuhr von Verunreinigungen wie Abwasser und Bodenabspülungen meistens höher als in anderen Oberflächengewässern (Daubner, 1984).

Bei allen Mikroorganismen beeinflusst unter anderem die Umgebungstemperatur die Stoffwechselfähigkeit und Wachstumsrate. Während psychrophile Mikroorganismen Temperaturen von -10 °C bis 25 °C tolerieren, liegt diese Spanne bei mesophilen zwischen 10 °C und 50 °C und bei thermophilen zwischen 25 °C und 100 °C. Daher spielen in den kalten Klimazonen psychrophile und in den wärmeren Zonen mesophile Mikroorganismen eine Rolle. Somit ist auch der biologische Abbau von organischen Substanzen temperaturabhängig. Die optimalen Bedingungen für die Bakterien werden außerdem von anderen Faktoren wie pH-Wert, Nahrungsversorgung, Stoffwechselprodukte usw. beeinflusst. Das pH-Optimum der

meisten Gewässerbakterien liegt zwischen 4 und 9. Im Allgemeinen ist für Bakterien ein neutraler oder schwach alkalischer pH-Wert (7,0-7,4) am günstigsten (Daubner, 1984, Rheinheimer, 1991). Das Umweltbundesamt (1997) gibt für Oberflächenwasser einen pH-Wert von 7,90 bis 8,30 an. Giese (2004) misst einen pH-Wert von 7,72 bis 8,09 im Wasser der Spree in Berlin.

2.5.2 Abbau von Steroidhormonen

Jürgens et al. (2002) untersuchen den Abbau von Östrogenen im Flusswasser. In Wasserproben aus Flüssen in England, die bei 20 °C gelagert wurden, transformieren Mikroorganismen 17 -Östradiol in Östron. Dabei werden Halbwertzeiten von 0,2-9 Tagen gemessen. Östron wird anschließend weiter biodegradiert. Giese et al. (2003, 2004) weisen nach, dass eine manipulierte Östronkonzentration im Flusswasser bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C nach 14 Tagen nahezu vollständig abgeklungen war. Bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C wurden erst nach 56 Tagen Minimalwerte der Östronkonzentration erreicht. Bei Kontrollversuchen mit sterilisiertem Flusswasser konnte keine Konzentrationsabnahme festgestellt werden. Für Untersuchungen zum Abbau von Östrogenen durch Bakterien in Reinkultur isolierte Giese (2004) die Keime *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aeromonas hydrophila* aus Flusswasser. Die separate Inkubation dieser Keime mit Östron in wässriger Lösung ergab keinen Konzentrationsverlust des Östrons, weshalb vollständige degradierende Eigenschaften dieser Keime ausgeschlossen werden können. Umfangreiche Interaktionen von Mikroorganismen innerhalb der Wasser-Biozönose könnten für eine vollständige Degradation organischer Substanzen verantwortlich sein (Servais et al., 1987). Für Östrogene geben Williams et al. (1999) eine Halbwertzeit von 2 bis 6 Tagen im Wasser und im Sediment an.

Kang und Kondo (2002) konnten *Pseudomonas*-Spezies identifizieren, die im Flusswasser Bisphenol A abbauten. In ähnlichem Zusammenhang zeigen Forschungsergebnisse von Lai et al. (2002), dass die Frischwasseralge *Chlorella vulgaris* zur Biotransformation von Östrogenen in der Lage ist.

Der Abbau von Progesteron im Oberflächenwasser ist bisher noch nicht beschrieben worden.

2.6 Schlussfolgerung

Bislang gibt es keine Untersuchungen zum Abbau von Progesteron in der aquatischen Umwelt. Das Literaturstudium ermöglicht eine weitere Konkretisierung der Aufgabenstellung. In den Untersuchungen dieser Arbeit sollen Antworten auf die folgenden Fragen gefunden werden:

- Sind Mikroorganismen im Flusswasser in der Lage Progesteron abzubauen?
- Wie ist die Abbauleistung von Mikroorganismen im Belebtschlamm im Vergleich zu Mikroorganismen im Flusswasser?
- Hat die Wassertemperatur einen Einfluss auf die Geschwindigkeit eines möglichen Abbaus?
- Sind andere chemische Faktoren am möglichen Progesteronabbau beteiligt?
- Gibt es einzelne Bakterienspezies im Flusswasser, die separat einen Progesteronabbau bewirken können?