

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Biodegradation von Testosteron im  
Oberflächenwasser**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Heike Poltrock**  
Tierärztin aus Rahden, Westf.

Berlin 2010  
Journal-Nr. 3442

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. G. Schlenker  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Heidrun Fink  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

biodegradation, androgens, testosterone, surface water, enzyme  
immunoassay

Tag der Promotion: 24.03.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-990-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © flucas - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Endokrine Disruption	2
2.2	Androgene als endokrine Disruptoren	6
2.2.1	Xenoandrogene	6
2.2.2	Phytoandrogene	7
2.2.3	Synthetische Androgene	9
2.2.4	Endogene Androgene	9
2.2.5	Quellen und mögliche Eintragspfade von Androgenen in die Umwelt	14
2.2.5.1	Menschen	14
2.2.5.2	Lebensmittelliefernde Tiere	15
2.2.5.3	Fischwirtschaft	17
2.2.6	Vorkommen von Androgenen bzw. androgen wirksamen Substanzen in Gewässern	17
2.2.7	Auswirkungen von Androgenen bzw. androgen wirksamen Substanzen auf die Umwelt	19
2.3	Stabilität von Androgenen in der Umwelt	21
2.3.1	Photodegradation von Steroidhormonen	22
2.3.2	Mikrobielle Degradation von Steroidhormonen	22
2.3.2.1	Biodegradation von Steroidhormonen im Oberflächenwasser	25
2.3.2.2	Biodegradation von Steroidhormonen im Boden	26
2.3.3	Sorptionsverhalten von Steroidhormonen im Boden	28
2.4	Nachweisverfahren	29
2.4.1	Nachweis von androgener Aktivität	29
2.4.2	Nachweis von Androgenen	31
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Versuchsaufbau	32
3.1.1	Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser (Versuchsreihen FW I-VII)	32

3.1.2	Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilisiertem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV)	34
3.1.3	Vergleich des Verlaufs der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (Versuchsreihen H I-II)	34
3.1.4	Herstellung der Lösungen für die Versuchsansätze	36
3.1.4.1	Herstellung der Hormonstammlösungen	36
3.1.4.2	Herstellung des Assaypuffers	36
3.1.4.3	Isolierung von Bakterien und Herstellung von Bakterien-Reinkulturen	37
3.1.5	Kontrolle der Versuchsansätze durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	37
3.2	Hormonbestimmung mittels Enzymimmunoassay	38
3.2.1	Vorbereitung der Mikrotiterplatte	39
3.2.2	Bestückung der Mikrotiterplatte	39
3.2.3	Belegung der Mikrotiterplatten	40
3.2.4	Färbung	41
3.2.5	Messung der Extinktion	41
3.2.6	Herstellung der Lösungen und Reagenzien für den Enzymimmunoassay	42
3.3	Berechnung der Hormonkonzentration	44
3.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser (Versuchsreihen FW I-VII)	47
4.1.1	Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 28 Tage (Versuchsreihen FW I-IV)	47
4.1.1.1	Verlauf der Testosteronkonzentration in nicht sterilisiertem Flusswasser	47
4.1.1.2	Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser	50
4.1.1.3	Verlauf der Testosteronkonzentration in Aqua bidest.	52
4.1.2	Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 6 Tage (Versuchsreihen FW V-VII)	53
4.1.2.1	Verlauf der Testosteronkonzentration in nicht sterilisiertem Flusswasser	54
4.1.2.2	Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser	55

4.1.3	Zusammenfassung der Versuchsreihen FW I-VII	56
4.2	Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV)	57
4.2.1	Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer <i>Alcaligenes faecalis</i> – Suspension (Versuchsreihen AF I-IV)	58
4.2.2	Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer <i>Aeromonas sobria</i> – Suspension (Versuchsreihen AS I-IV)	60
4.2.3	Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer <i>Citrobacter freundii</i> – Suspension (Versuchsreihen CF I-IV)	63
4.2.4	Zusammenfassung der Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV	65
4.3	Vergleich der Konzentrationsverläufe von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (Versuchsreihen H I-II)	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	68
5.1	Abbau von Testosteron im Flusswasser	68
5.2	Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus	72
5.3	Ökologisches Gefährdungspotenzial durch Testosteron	74
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	78
<b>7</b>	<b>Summary</b>	80
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	82
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	103
9.1	Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser	103
9.2	Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilisiertem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur	119
9.3	Verlauf der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser	132
	<b>Danksagung</b>	139
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	140



# 1 Einleitung

Aufgrund sich häufender Dokumentationen über Störungen in der Reproduktion und Geschlechtsentwicklung bei v.a. im Wasser lebenden Wildtieren, ist in den letzten Jahren das Interesse von Öffentlichkeit und Forschung für das Vorkommen und die Auswirkungen von endokrinen Disruptoren in der Umwelt enorm gestiegen. Als endokrine Disruptoren gelten Stoffe, die aufgenommen werden und das hormonelle Gleichgewicht stören. Dies trifft für verschiedene Chemikalien und Pestizide zu, aber auch für endogene und synthetische Steroidhormone, die von Mensch und Tier ausgeschieden werden und direkt, mit den Abwässern oder über das Verbringen von Gülle, Mist und Klärschlamm auf landwirtschaftliche Flächen in Oberflächengewässer, Böden und Grundwasser gelangen können. Die kontinuierliche Intensivierung der Nutztierhaltung und die Ausbreitung urbaner Gebiete hat die territorial anfallenden Mengen menschlicher und tierischer Ausscheidungen immens erhöht und damit die Umweltbelastung mit von Mensch und landwirtschaftlichen Nutztieren stammenden natürlichen und synthetischen Steroidhormonen.

Obwohl das Hauptaugenmerk der Forschung zur Umweltbelastung mit Hormonen bisher dem Vorkommen und Verbleib von Östrogenen bzw. östrogen wirksamen Substanzen galt, haben Untersuchungen gezeigt, dass Androgene und androgene Effekte auf wildlebende Tiere in der aquatischen Umwelt präsent sind.

Wenig ist bisher bekannt über das Schicksal von Androgenen in verschiedenen Umweltmedien, insbesondere über den Abbau in Gewässern. Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss geben über die Stabilität von Testosteron im Oberflächenwasser, dem wichtigsten natürlichen Androgen.

Dazu wird Flusswasserproben unter Laborbedingungen eine definierte Menge an Testosteron zugeführt und anschließend der Verlauf der Testosteronkonzentration über einen bestimmten Zeitraum beobachtet, um den Abbau unter Berücksichtigung von Keimgehalt und Temperatur des Flusswassers zu prüfen.

Weiterhin wird der Abbau von Testosteron im Flusswasser mit dem Abbau von Östron und Progesteron verglichen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Endokrine Disruption

“Many potential modes of action and pathways leading to endocrine disruption have yet to be discovered and researched. Coupled with the growing list of xenobiotics that are endocrine active, we presently sit at the threshold of understanding what we define as “endocrine disruption”.” (De Guise et al., 2001)

Endokrine Disruption stellt ein globales Phänomen dar. In allen Teilen der Welt wurde von hormonell gesteuerten Fehlfunktionen im Tierreich, verbunden mit Fortpflanzungsstörungen bis hin zum Niedergang von Populationen berichtet. Die beschriebenen Effekte umfassen sowohl die Verweiblichung männlicher Individuen als auch die Vermännlichung weiblicher Tiere, die Schwächung von Schilddrüsen- und Immunfunktionen, sowie die Störung von Entwicklungsvorgängen (de Fur et al., 1999).

Einige Beispiele für diese Beeinflussung sind die Verweiblichung von Fischen in Flüssen unterhalb von Klärwerksabflüssen durch nicht vollständig eliminierte natürliche und synthetische Östrogene, wie  $17\beta$ -Östradiol, Östron und das Kontrazeptivum Ethinylöstradiol (Folmar et al., 1996, 2001; Gercken und Sordyl, 2002; Hassanin et al., 2002; Hecker et al., 2002; Aravindakshan et al., 2004; Kavanagh et al., 2004; Jobling et al., 2006). Ebenso wurden Verweiblichungen von Fischen in Flussmündungen (Matthiessen et al., 2002; Scott et al., 2006), Gonadenabnormalitäten und veränderte Hormonspiegel bei Alligatoren in Florida (Guillette et al., 1994), die Vermännlichung von Fischen, ausgelöst durch Abflüsse der papierherstellenden Industrie (siehe Kapitel 2.2.2) und massive Effekte von Tributylzinn aus Antifouling-Schiffsanstrichen auf marine Schneckenpopulationen (siehe Kapitel 2.2.1) beschrieben. Zahlreiche Reproduktionsstörungen bei Vögeln, der Populationsschwund von Seehunden im Wattenmeer, dem Florida-Panther, dem Europäischen Otter und Fälle von Pseudohermaphroditismus bei weiblichen Eisbärjungen wurden mit der Kontamination durch endokrin wirksame Substanzen wie polychlorierte Biphenyle (PCB) und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und dessen Metabolite in Verbindung gebracht (Reijnders, 1986; Facemire et al., 1995; Fry, 1995; Wiig et al., 1998; Roos et al., 2001).

Beim Menschen werden ein Rückgang von Spermienkonzentration und Samenvolumen in den letzten 50 Jahren, verringerte Spermienmotilität und die Zunahme von abnormen Spermienmorphologien, Hodenkrebs und Hodenhochstand dem Einfluss endokriner



Disruptoren zugeschrieben (Carlsen et al., 1992; Sharpe und Skakkebaek, 1993; Comhaire et al., 1996; Toppari et al., 1996). Ebenso wird ein Anstieg der Brustkrebsrate bei Frauen auf die Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen bezogen (Falck et al., 1992; Davis et al., 1993; De Guise et al., 2001).

Blount et al. (2000) untersuchten den Urin von Erwachsenen auf Phthalate, die am häufigsten verwendeten Weichmacher in Kunststoffen, und fanden bei Frauen im Alter von 20-40 Jahren deutlich höhere Gehalte an Monobutyl-Phthalaten, ein bei Nagern auf Reproduktion und Entwicklung wirkendes Toxin. Swan et al. (2005) bewiesen eine Korrelation zwischen den pränatalen Phthalat-Gehalten im Urin von Müttern und dem Vorkommen reduzierter Anogenital-Distanzen bei ihren Söhnen, einem Zeichen für eine pränatale Exposition mit antiandrogen wirksamen Stoffen. Damgaard et al. (2006) fanden im Vergleich zu Müttern von gesunden Jungen bei Müttern von kryptorchiden Jungen signifikant mehr persistente Pestizide in der Muttermilch, darunter auch DDTs. Die gefundenen Pestizide wurden teilweise seit Jahren nicht mehr in der Versuchsregion eingesetzt.

Shore et al. (1992) konnten zudem zeigen, dass auch Pflanzen hormonell beeinflussbar sind. So konnten sie das Wachstum von Alfalfapflanzen durch Östrogene im Gießwasser je nach Konzentration fördern oder hemmen.

1996 einigten sich beim Europäischen Workshop zum "Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife" über 70 Vertreter aus Wissenschaft und Behörden der EU, USA und Japan sowie von den Institutionen OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), WHO (World Health Organization) und den Interessenverbänden CEFIC (Verband der Europäischen chemischen Industrie) und WWF (World Wildlife Fund) auf folgende Definitionen (Weybridge Conference, 1996):

"An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, consequent to changes in endocrine function."

"A potential endocrine disrupter is a substance that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism."

Die Gruppe der hormonell aktiven Substanzen umfasst dabei diverse Verbindungen anthropogener und natürlicher Herkunft. Man unterscheidet zwischen natürlichen und synthetischen Hormonen, Xenohormonen und Phytohormonen. Sie haben eine große Bandbreite biophysikalischer Eigenschaften von persistent bis hin zu leicht abbaubar,

hydrophil zu lipophil und nichttoxisch zu hochtoxisch (Schulte-Oehlmann et al., 2005) und aufgrund der Komplexität der hormonellen Regulierung von Organismen können endokrine Disruptoren auf unterschiedlichste Weise einwirken. Sie können als Agonisten oder Antagonisten direkt mit den Hormonrezeptoren agieren oder das hormonelle Gleichgewicht indirekt stören, indem sie die Konzentrationen an freien endogenen Hormonen verändern durch die Einflussnahme auf deren Biosynthese, Metabolismus und Freisetzung, oder durch die Besetzung von Bindungsstellen an Transportproteinen (Kavlock et al., 1996; Lintelmann et al., 2003). Auch die Konzentration von Hormonrezeptoren kann durch exogene Stoffe beeinflusst werden (Safe und Krishnan, 1995).

Von einigen hundert Stoffen ist bisher ihre endokrine Wirksamkeit bekannt (Gülden et al., 1997), aber die Zahl der noch ungeprüften Stoffe ist groß und es ist möglich, dass, in Anbetracht von über 80000 Chemikalien im Umlauf (Tully et al., 2000), mehrere hundert oder tausend Substanzen bisher unerkannte endokrine Disruptoren sind (De Guise et al., 2001).

Aufgrund der zahlreichen Beobachtungen bei Wildtieren verbunden mit dem vermehrten Auftreten von Fortpflanzungsstörungen beim Menschen, galt das Hauptinteresse bisher vorwiegend der Erforschung schädigender Einflüsse hormonell wirksamer Substanzen auf sexualsteroidvermittelte Vorgänge der Fortpflanzung, sexuellen Entwicklung und Differenzierung (Colborn et al. 1993; Duft et al. 2003; Jobling et al. 2004), insbesondere im Hinblick auf östrogen wirksame Chemikalien, den Xenoöstrogenen (Gülden et al., 1997).

Zu den Xenoöstrogenen gehören verschiedene Pestizide (z.B. DDT und seine Metabolite, Vinclozolin, Linuron), polychlorierte Biphenyle (PCBs), Alkylphenole, Phthalate und Bisphenol A, eins der wichtigsten Chemikalien weltweit. Organozinnverbindungen, wie z.B. Tributylzinn (TBT), rufen androgene Effekte hervor und lassen sich somit als Xenoandrogene bezeichnen.

Problematisch an Xenohormonen sind die teilweise sehr hohen Persistenzen in der Umwelt verbunden mit hohen Produktionsmengen und umfassenden Einsatzbereichen weltweit. DDT und seine Metabolite etwa haben Halbwertszeiten von 3 bis 20 Jahren und wurden, trotz des Verbots von Gebrauch und Produktion in vielen Industrieländern seit den 1970ern, in Entwicklungsländern etwa als preisgünstiges Mittel zur Malariabekämpfung eingesetzt. Schätzungsweise 2 Mio. Tonnen sollen seitdem in die Umwelt gelangt sein (Lintelmann et al., 2003). Auch für PCBs gibt es einen nahezu

internationalen Produktionsstopp seit den 1970ern und 1980ern. Man schätzt den derzeitigen Weltbestand auf 1,2 Mio. Tonnen, von denen ein Drittel in der Umwelt zirkuliert. Die weltweite Produktion von beispielsweise Alkylphenolen und Bisphenol A beträgt jeweils mehrere hunderttausend Tonnen pro Jahr (Duursma und Carroll, 1996; Lintelmann et al., 2003).

Auch Pflanzen produzieren hormonähnliche Wirkstoffe, sogenannte Phytohormone. Phytoöstrogene werden als Alternative zur Hormonersatztherapie während der Menopause eingesetzt und scheinen einen vorbeugenden Effekt auf einige Krebserkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und Osteoporose zu haben (Cornwell et al., 2004). Genistein beispielsweise ist ein Phytoöstrogen, das in Soja, aber u.a. auch in Erdklee und schwarzen Bohnen vorkommt und die Fruchtbarkeit von Schafen und Vögeln herabsetzt. Ernährungsbedingt nehmen besonders Asiaten hohe Genisteinmengen ein. So liegt der Genisteingehalt des Blutes von Japanern 43fach über dem von Finnen. Es zeigte sich, daß Japanerinnen im Vergleich zu Frauen in westlichen Ländern einen auf durchschnittlich 32 Tage verlängerten Periodenzyklus aufweisen und gleichzeitig ein um 25 Prozent reduziertes Brustkrebsrisiko haben (GDCh, 2000).

In den Untersuchungen von Lorenzen et al. (2004) zeigte sich, dass in Ausscheidungen von Milchkühen, deren Futter Soja enthielt, deutlich höhere östrogene Aktivitäten nachzuweisen waren, als in Ausscheidungen von Milchkühen mit sojafreier Fütterung.

In den letzten Jahren sind aufgrund der enormen Populationsgrößen vermehrt der Mensch und lebensmittelliefernde Tiere als Quellen für natürliche und synthetische Hormone ins Blickfeld gerückt. Natürliche Hormone, die von Menschen und Tieren ausgeschieden werden, sind höchst wirksam und können bereits in Konzentrationen von wenigen ng/L Veränderungen bei aquatischen Lebewesen hervorrufen (Kolodziej et al., 2003; Barel-Cohen et al., 2006).

Im Hinblick auf endokrine Störungen von Wildtieren durch synthetische Hormone fallen aufgrund ihrer verbreiteten Anwendung besonders die Kontrazeptiva ins Gewicht. 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol wurde in Klärwerksabflüssen und erhaltenden Gewässern nachgewiesen (Kolpin et al., 2002; Ying et al., 2002; Cargouët et al., 2004; Barel-Cohen et al., 2006). Es induziert bei männlichen Regenbogenforellen bereits ab einer Konzentration von 0,1 ng/L die Produktion von Vitellogenin, ein Protein, dass normalerweise nur von Weibchen produziert wird (Purdom et al., 1994). Pawlowski et al. (2004b) stellten bei Fettkopfbrassen LOECs (lowest observed effective concentration) von 1 ng/L für

Veränderungen in den Hoden und die Produktion von Vitellogenin und 0,1 ng/L für veränderte durchschnittliche Anzahlen an bebrüteten Eiern pro Paar fest.

In Europa verboten, aber in anderen Ländern, wie etwa den USA, durchaus etabliert ist die hormonelle Substitution in der Rindermast. Üblich und weitverbreitet ist die Verwendung des androgenen Steroids Trenbolonacetat (Schiffer et al., 2001), dass in Abwässern von Mastviehanlagen und anliegenden Flüssen nachgewiesen wurde (Soto et al., 2004; Durhan et al., 2006).

An der östrogenen bzw. androgenen Aktivität von Wasserproben aus belasteten Gewässern sind die synthetischen Hormone aber meist in geringerem Ausmaß beteiligt als die natürlichen Östrogene und Androgene (Williams et al., 2003; Furuichi et al., 2004; Soto et al., 2004; Labadie und Budzinski, 2005). Über ihre Stabilität außerhalb des Organismus ist bisher noch wenig bekannt, aber in Abflüssen von Kläranlagen, in Klärschlamm und auch in länger gelagerten Exkretionen von Tieren wurden natürliche Östrogene, Androgene und Gestagene nachgewiesen (Tabak et al., 1981; Shore et al., 1993a; Shore et al., 1993b; Schlenker et al., 1999a; Kirk et al., 2002; Kolodziej et al., 2003; Lorenzen et al., 2004). In Gewässern fand man Östrogen- und Androgenkonzentrationen, die bei Fischen Effekte hervorrufen können, und auch in Grund- und Quellwasser konnten Östrogene und Androgene nachgewiesen werden (Shore et al., 1993a; Peterson et al., 2000; Kolpin et al., 2002; Kolodziej et al., 2003; Shore et al., 2004; Barel-Cohen et al., 2006).

## **2.2 Androgene als endokrine Disruptoren**

### **2.2.1 Xenoandrogene**

Xenoandrogene Substanzen sind androgen wirksame Substanzen. Bisher bekannte Xenoandrogene sind Triphenylzinn (TPT) und Fenarimol, die in der Landwirtschaft als Pestizide eingesetzt werden und das hochtoxische Tributylzinn (TBT), dessen Verwendung in Antifouling-Anstrichen für Schiffsrümpfe 2003 von der Internationalen Seeschiffahrts-Organisation (IMO) verboten wurde. Fenarimol zeigte im Tierversuch u.a. teratogene und onkogene Wirkung (Hirsch et al., 1987).

Untersuchungen in den verschiedensten Teilen der Welt, einschließlich der Antarktis, belegen eine Kontamination mit Butyl- und auch Phenylzinn-Verbindungen (de Mora et al., 2003; Marshall und Rajkumar, 2003; Negri et al., 2004; Jones et al., 2005; Leung et al., 2005; Shim et al., 2005), in Japan auch 11 Jahre nach Gebrauchseinschränkungen (Murai et al., 2005). In Leberproben von 2005 in Japan gestrandeten Killerwalen fand man

neben DDTs und PCBs Butylzinnrückstände von 13 bis 770 ng/g (Feuchtgewicht), was auf einen extensiven Gebrauch von TBT in Antifouling-Anstrichen hinweist (Kajiwara et al., 2006).

Tributylzinn ist eine organische Verbindung, die bei verschiedenen Schneckenspezies bereits in niedrigen Konzentrationen von einigen ng/L Maskulinisierungseffekte erzielt (Fent, 1996). Es ließ sich nachweisen, dass Tributyl- und Triphenylzinnverbindungen Schlüsselenzyme des Sexualsteroidmetabolismus, und somit die endogenen Hormonkonzentrationen der Tiere beeinflussen (Spooner et al., 1991; Bettin et al., 1996; Horiguchi et al., 1997; Gooding et al., 2003; Oehlmann und Schulte-Oehlmann 2003). Es wird vermutet, dass die maskulisierende Wirkung auf der Hemmung der Cytochrom *P450*-abhängigen Aromatase beruht, die im Hormonstoffwechsel die Synthese von Östrogenen aus Androgenen übernimmt (Schulte-Oehlmann et al., 1995). Auf gleicher Ebene konnten auch beim Schwein und beim Menschen Effekte festgestellt werden (Heidrich et al., 2001; Doering et al., 2002; Ohno et al., 2005).

In Tierversuchen mit Apfelschnecken (*Marisa cornuarietis*) und Federsternen (*Antedon mediterranea*) verursachten Tributylzinn, Triphenylzinn und Fenarimol erhöhte Testosteronspiegel, Imposex und verringerte Fruchtbarkeit bei weiblichen Tieren und Störungen bei der skelettalen Entwicklung (Janer et al., 2006; Lavado et al., 2006). Schulte-Oehlmann et al. (2005) exponierten Eier (F0-Generation) von *Acartia tonsa*, einem Ruderfußkrebs, mit TPT, was zu einer signifikanten Hemmung der Larvalentwicklung führte. Bei der Wiederholung dieses Versuchs an Eiern von Weibchen, die selbst während ihrer gesamten Lebenszeit TPT ausgesetzt waren (F1-Generation), ist dieser Effekt noch ausgeprägter, da die Sensitivität der Filialgenerationen gegenüber der Testsubstanz zunimmt. In einem weiteren Experiment mit Fenarimol konnten für *Acartia tonsa* vergleichbare Effekte festgestellt werden, wobei die Sensitivität der F1-Generation gegenüber der F0-Generation um den Faktor 10 erhöht war (Schulte-Oehlmann et al., 2005).

### **2.2.2 Phytoandrogene**

Flußabwärts von Papier- und Zellstofffabriken in Florida, USA, entwickelten weibliche Mosquitofische (*Gambusia* sp.) verlängerte Afterflossen-Strahlen, ähnlich dem männlichen Gonopodium (Howell et al., 1980; Bortone et al., 1989; Cody et al., 1997); eine Erscheinung, die Angus et al. (2001) bei juvenilen weiblichen Mosquitofischen (*G. affinis*) durch eine androgene Stimulation mit 11-Ketotestosteron hervorriefen. Gleiche

Veränderungen zeigten weibliche Zahnkarpfen (*Poeciliidae*), ebenfalls lebendgebärende Fische, nach der Behandlung mit Androgenen (Turner, 1960).

Ebenfalls in Florida fand man eine Population juveniler Amerikanischer Aale (*Anguilla rostrata*), die ein gesteigertes Hodenwachstum und vergrößerte Augendurchmesser aufzeigten (Caruso et al., 1988); sekundäre Geschlechtsmerkmale, die Olivereau und Olivereau (1985) bei Silberaalen durch die Behandlung mit Methyltestosteron erzeugten.

In nordamerikanischen Studien wurden bei Fischen, die Abwässern von Zellstofffabriken ausgesetzt waren, erniedrigte Plasmaspiegel endogener Steroidhormone nachgewiesen, oft in Kombination mit einer Verringerung der Größe der Gonaden und verzögerter sexueller Reife (McMaster et al., 1991, 1995; van der Kraak et al., 1992; Munkittrick et al. 1994, 1997;). Larsson et al. (2000) stellten bei Aalmutterweibchen in etwa 1,5 km Nähe zu einem Abwassereinlauf einer Zellstofffabrik in die Ostsee signifikant weniger weibliche Embryonen fest. Weiter südlich war die Geschlechterverteilung denen der Referenzgruppen wieder ähnlich. Larsson et al. (2000) vermuten, dass endokrin wirksame Substanzen in den Fabrikabwässern über die Mutter, möglicherweise über den Eidotter, auf die Embryonen wirken.

Bisher sind die ursächlichen Substanzen noch nicht identifiziert, aber man geht davon aus, dass sie bei der Verarbeitung des Holzes frei werden und auf Lignin und/oder Terpentoide zurückzuführen sind (Hewitt et al., 2006). Conner et al. (1976) konnten zeigen, daß Abwässer der Papierindustrie beträchtliche Mengen an Phytosterolen, insbesondere  $\beta$ -Sitosterol, enthalten.  $\beta$ -Sitosterol wird neben Cholesterol und Stigmasterol durch allgemein in der Erde vorkommende Bakterien, wie *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* und *Nocardia* zu Androstendion und Androstendiendion abgebaut (Nagasawa et al., 1969). Denton et al. (1985) und Howell und Denton (1989) konnten ebenfalls zeigen, dass  $\beta$ -Sitosterol durch das *Mycobacterium smegmatis* in ein oder mehrere Steroide umgewandelt wurde, das oder die weibliche Mosquitofische maskulinisieren.

In Wasserproben vom Fenholloway River, Florida (USA), der Abwässer einer Papierfabrik erhält, konnten Jenkins et al. (2001) und Parks et al. (2001) das Vorhandensein von androgen wirksamen Substanzen nachweisen. Jenkins et al. (2001) schreiben Androstendion (4-Androsten-3,17-dion) für die androgene Aktivität verantwortlich. In einer späteren Studie weisen Jenkins et al. (2003) im Wasser und im Sediment des Fenholloway River neben Androstendion auch Progesteron nach und gehen davon aus, dass Progesteron ein Intermediärprodukt beim mikrobiellen Abbau von Phytosteroiden zu Androstendion ist. Eine weitere, nicht identifizierbare Substanz mit stärkerer androgener Aktivität als Androstendion wird ebenfalls nachgewiesen. Durhan et al. (2002) weisen

zwar ebenfalls das Vorhandensein von Androstendion im Wasser des Fenholloway River in Konzentrationen von >100 ng/L nach; die Ergebnisse zeigen aber, dass Androstendion nicht an der gemessenen androgenen Aktivität beteiligt ist.

### **2.2.3 Synthetische Androgene**

Im Gegensatz zu Europa, wo der Einsatz hormoneller Substanzen zur Förderung der Mastleistung bei lebensmittelliefernden Tieren verboten ist (Richtlinie 96/22/EG), werden Mastförderer in anderen Ländern, wie den USA, Kanada, Australien und Neuseeland, regulär eingesetzt (Lange et al., 2002; Morthorst et al., 2010). In den USA erhielten laut Balter (1999) annähernd 90 % der Rinder, die der Fleischgewinnung dienen, hormonelle Substitutionen. Neben den natürlichen Hormonen Testosteron, Östradiol und Progesteron kommen dafür vor allem die synthetischen Substanzen Trenbolon, Zeranol und Melengestrol zum Einsatz. Üblich und weitverbreitet ist die subkutane Implantation von Trenbolonacetat (TBA). Wahrscheinlich mehrere Tonnen des androgenen Steroids werden jährlich in den USA und Kanada eingesetzt (Schiffer et al., 2001).

In den Ausscheidungen der behandelten Rinder finden sich Trenbolonacetat, der aktive Metabolit 17 $\beta$ -Trenbolon und zum größten Teil das schwach wirkende 17 $\alpha$ -Trenbolon (Schopper und Hoffmann, 1981). Noch 2-3 Monate nach der Implantation sind deutliche Mengen in Kot, Urin, Plasma und verschiedenen Geweben nachweisbar (Schopper und Hoffmann, 1981; Vogt, 1984).

Trenbolon zeigt am menschlichen Androgen-Rezeptor und dem von Ratten eine ähnliche oder stärkere Wirkung als das hochpotente natürliche Dihydrotestosteron und bewirkt bei weiblichen Rattenjungen, deren Mütter während der Trächtigkeit mit Trenbolon behandelt wurden, morphologische Veränderungen am Reproduktionstrakt, die auf eine teratogene Wirkung hinweisen (Wilson et al., 2002). Bei Fettkopfbrassen, die Trenbolon ausgesetzt waren, zeigten sich Veränderungen in der Reproduktionsbiologie sowohl männlicher als auch weiblicher Tiere (Ankley et al., 2003) und ähnliche Veränderungen fand man bei wildlebenden Fettkopfbrassen in Flüssen nahe Rindermastanlagen (Jegou et al., 2001; Orlando et al., 2004), in dessen Wasser androgene Aktivitäten und Trenbolonmetabolite nachgewiesen wurden (Soto et al., 2004; Durhan et al., 2006). Morthorst et al. (2010) exponierten Zebrafische nach dem Schlüpfen mit 17 $\beta$ -Trenbolon und produzierten so in Abhängigkeit der Dosis ein verschobenes Geschlechterverhältnis zugunsten männlicher Individuen bis hin zu rein männlichen Populationen.

## 2.2.4 Endogene Androgene

Androgene gehören zu den Steroidhormonen, die nach der Anzahl der Kohlenstoffatome in C 21- (Gestagene, Kortikoide), C 19- (Androgene) und C 18-Steroide (Östrogene) eingeteilt werden. Die wichtigsten Androgene sind neben Testosteron Dihydrotestosteron, das etwa doppelt so wirksam ist wie Testosteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteron (Williams-Ashman, 1975; Bamberg, 1994).

Androgene bewirken das Wachstum und die Ausbildung der Funktion der primären und sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale (Voss und Oertel, 1973). Weiter sind sie verantwortlich für die männliche Libido (Davidson, 1977) und das Aggressionsverhalten männlicher Säugetiere und Vögel (Wingfield und Marler, 1988). Auch auf Stoffwechselforgänge, wie Eiweiß-, Fettstoffwechsel, Elektrolyt- und Wasserhaushalt wirken sie ein, wobei die anabole Wirkung auf den Eiweißstoffwechsel wohl die wichtigste Stoffwechselwirkung ist (Krüskemper, 1965; Williams-Ashman, 1975). Die ebenfalls stimulierte Erythropoese begründet in Deutschland die einzige Indikation für den Einsatz von Anabolika beim Menschen (Gärtner und Haen, 2001). In der Veterinärmedizin haben Androgene nur in der Kleintierpraxis eine gewisse Bedeutung zur therapeutischen Verwendung in der Rekonvaleszenz, nach schweren Operationen, bei chronischen Leber- und Nierenerkrankungen und Muskeldystrophie. Bei lebensmittelliefernden Tieren darf in Europa Testosteron selbst nur zur Therapie von Fruchtbarkeitsstörungen eingesetzt werden (Kroker, 2006).

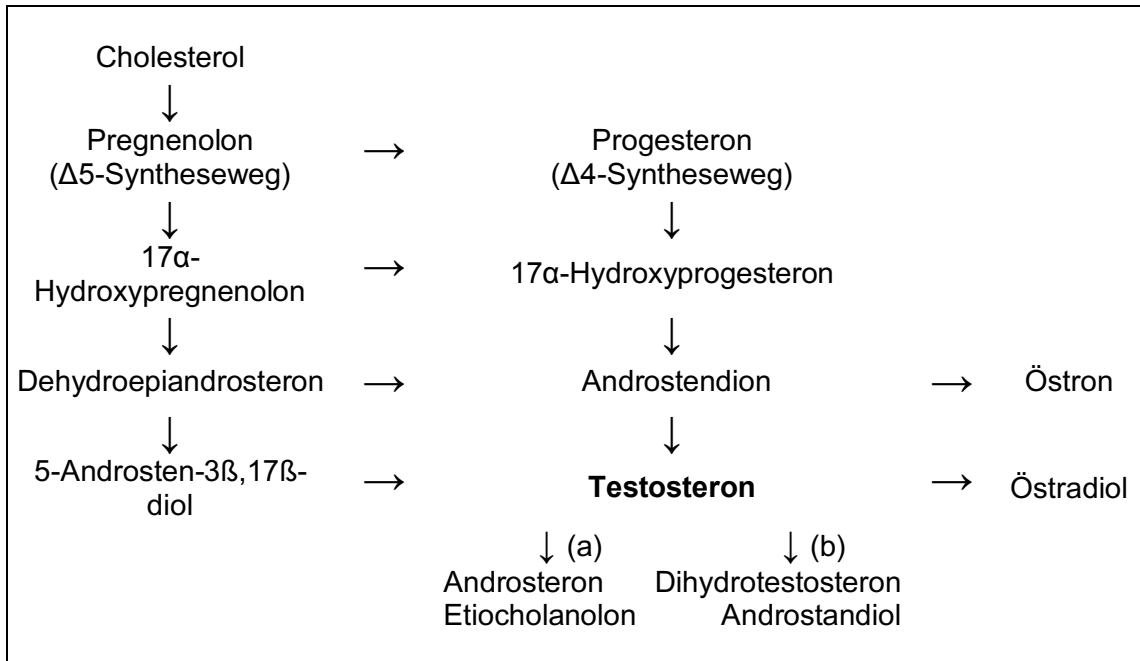
Die Wirkung der Androgene erfolgt, wie bei allen Sexualhormonen, über die Induktion der Synthese von Proteinen, die wiederum die Hormonwirkung im Zielgewebe vermitteln (Martin, 1985).

### Biosynthese, Transport und Wirkmechanismus

Das Cholesterin ist die Vorstufe aller Steroidhormone. Es wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in Darmschleimhaut, Nebennierenrinde und Gonaden aus Acetyl-CoA aufgebaut. Je nach Enzymausstattung der endokrinen Gewebe erfolgt die Biosynthese der Steroide vom Cholesterin ausgehend über die Gestagene zu den Androgenen und Östrogenen. Der erste Schritt, der durch das gonadotrope LH stimuliert wird, erfolgt in den Mitochondrien und ist die Umwandlung des Cholesterins in Pregnenolon. Die Bildung der Androgene, die in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens, in der Theca interna des Ovars, der Plazenta und in der Nebennierenrinde stattfindet, erfolgt nun auf zwei möglichen Wegen (s. Abb. 2.1). Der erste Weg ( $\Delta^5$ -Syntheseweg) führt über Pregnenolon (P5),  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und 5-Androsten- $3\beta,17\beta$ -



diol zu Testosteron. Der andere ( $\Delta 4$ -Syntheseweg) führt über Progesteron (P4), das aus dem Pregnenolon hervorgeht, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion zu Testosteron (Neher, 1968; Bamberg, 1994).



(a) = 17-Keto-Stoffwechselweg  
(b) = 17-Hydroxy-Stoffwechselweg

**Abb. 2.1: Übersichtsschema Biosynthese und Metabolisierung von Testosteron**

Männer produzieren im Mittel 6,7 mg Testosteron pro Tag (Vermeulen, 1968), Frauen im Durchschnitt 230  $\mu$ g Testosteron und 3,7 mg Androstendion (Bardin und Lipsett, 1968). Die tägliche Testosteron-Produktionsrate im Hoden von Bulle, Schafbock und Eber beträgt zwischen 3 und 10 mg und die Testosteronkonzentration im Blut geschlechtsreifer männlicher Tiere beträgt 1-10  $\mu$ g/L (Döcke, 1981; Bamberg, 1994), die im Blut eines Mannes durchschnittlich 7,2  $\mu$ g/L (Vermeulen, 1968).

Die Testosteronkonzentration im Blut unterliegt dabei bei verschiedenen Tierarten, wie Schafbock und Bulle einem Tages- und z.B. bei Schafbock (Herbst und Winter) und Hengst (Frühling) einem Jahresrhythmus (Bamberg, 1994).

Im Blutplasma vieler Säugetiere ist der Großteil an Testosteron und anderen Androgenen an das sex-hormone-binding globulin (SHBG) gebunden (Horton, 1979; Williams-Ashman, 1979). Auch an Albumin kann Testosteron gebunden sein. Des weiteren wurde in Hoden

und Nebenhoden das androgen-binding protein (ABP) gefunden, das in den Sertolizellen synthetisiert und in das Lumen der Tubuli seminiferi sezerniert wird und dort an der Aufnahme von Testosteron in die Zellen beteiligt sein soll (Williams-Ashman, 1979).

Um hormonell aktiv zu sein und um in die Zielzellen zu gelangen, ist es erforderlich, dass Testosteron oder andere Androgene in freier Form oder an Albumin gebunden vorliegen (Horton, 1979; Williams-Ashman, 1979). Da Androgene hydrophobe Ringmoleküle sind, stellt die Zellmembran keine Barriere dar und sie gelangen durch einfache Diffusion in die Zelle, wo sie an die Steroidbindungsdomäne des Androgen-Rezeptors binden (Meyer, 1994). Die daraufhin erfolgende Dimerisierung und Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht es dem Rezeptor-Hormon-Komplex in den Zellkern zu wandern. Hier bindet der Komplex mit der DNA-Bindungsdomäne des Rezeptors an die DNA und induziert die Synthese von RNA. Die in der Folge gebildete mRNA ist Vorlage für die Translation an den Ribosomen (Meyer, 1994).

#### Metabolisierung und Ausscheidung

Androgene werden mit der Galle über den Darmtrakt oder mit dem Urin ausgeschieden. In Ausscheidungen wurden Testosteron und auch dessen Metabolite gefunden. Die Inaktivierung erfolgt dabei vorwiegend in der Leber, aber auch Nieren, Prostata, Haut und Brustdrüse besitzen Enzymsysteme, die das Testosteronmolekül in verschiedene Metabolite umwandeln können (Staib, 1968). Dabei gibt es zwei Stoffwechselwege des Testosterons (s. Abb. 2.1). Beim 17-Keto-Weg entstehen Androsteron und Etiocholanolon, die wichtigsten Testosteronmetabolite im menschlichen Harn (Staib, 1968). Beim zweiten, dem 17-Hydroxy-Stoffwechselweg, bleibt die 17 $\beta$ -Hydroxylgruppe erhalten und die Inaktivierung erfolgt nur am Ring A, wobei Dihydrotestosteron und Androstandiol entstehen (Staib, 1968; Horton, 1979). Die Umwandlung des Testosterons in das wirkungsstärkere Dihydrotestosteron erfolgt vornehmlich in Zielgeweben, wie z.B. Gehirn und Reproduktionstrakt (Shahidi, 2001).

Eine Konjugierung mit Glukuronsäure bzw. eine Veresterung mit Schwefelsäure macht die lipophilen Verbindungen besser wasserlöslich und somit mit Harn und Galle ausscheidbar. Im Kot finden sich vorwiegend freie Hormone (Schwarzenberger et al., 1996; Möhle et al., 2002), da gewisse Darmbakterien in der Lage sind die Hormonkonjugate zu hydrolysieren. Im Urin dagegen ist der Anteil an Konjugaten groß (Neher, 1968; Möhle et al., 2002).

Laut Lange et al. (2002) werden Androgene als 17 $\beta$ -, 17 $\alpha$ -Testosteron und Androstendion ausgeschieden. Die Verteilung der Exkretion über Galle oder Harn variiert dabei zwischen

den verschiedenen Tierarten. So konnte Velle (1976) im Kot von Bullen etwa 90 % des vorher verabreichten, radiomarkierten Testosterons als Epitestosteron wiederfinden, wogegen Palme et al. (1996) beim Schwein eine hauptsächliche Ausscheidung über den Harn (86 %) nachwies. Die ausgeschiedenen Mengen an Androgenen decken sich nicht unbedingt mit den Produktionsmengen (Lange et al., 2002) und variieren in Abhängigkeit von Tierart, Geschlecht, Alter, Reproduktionsstatus und auch Fütterung (Lorenzen et al., 2004). Daten hierüber in der Literatur sind aber äußerst rar.

So scheiden Bullen im Mittel 107 µg, kastrierte Bullen 56 µg und Jungbullen 6,2-60 µg Testosteron pro Tag mit dem Urin aus (Wollrab und Ittrich, 1974). Lange et al. (2002) schätzten für Bullen eine jährliche Androgenausscheidung von 390 mg und für männliche Kälber 120 mg pro Tier. Johnson et al. (2006) schätzen die Testosteronausscheidung auf Basis von Testosteronmengen in Kälberurin und – kot auf 300 µg/d bzw. 110 mg/Jahr pro Bulle.

Zur Androgenausscheidung beim Schwein übernehmen Lange et al. (2002) und Johnson et al. (2006) den von Navrátil und Matoušková (1978) ermittelten Wert von 1570 µg Testosteron pro Tag pro Eber als Grundlage ihrer Schätzungen zum Beitrag landwirtschaftlicher Nutztiere an der Belastung der Umwelt durch Steroidhormone. Erwähnenswert sei, dass Busch und Ittrich (1970) Testosterongehalte im Urin von 1000-3270 µg/L bei murenen Ebern, 100-600 µg/L bei Jungebern bis 8 Monate und 80-110 µg/L bei Kastraten gefunden haben.

In frischem Mist von Masthühnern fanden Shore et al. (1993b) unabhängig vom Geschlecht Testosteronkonzentrationen von 133 µg/kg TM. Finlay-Moore et al. (2000) wiesen 15-55 µg Testosteron/kg Mist von 6-8 Wochen alten Masthühnern beider Geschlechter nach. Lange et al. (2002) geben jährliche Testosteronausscheidungen von jeweils 0,7 mg pro weibliches und männliches Masthuhn, 3,4 mg pro Legehennen und 8,9 mg pro Hahn an.

Ausreichend beschrieben ist die Testosteronausscheidung des Menschen mit dem Urin. So scheidet der Mann durchschnittlich um die 70 µg Testosteron (Dorfman, 1968; Vermeulen, 1968) und 52 µg Epitestosteron (Dorfman, 1968) und die Frau zwischen 2,5 und 10 µg Testosteron (Dorfman, 1968; Ismail, 1968) und zwischen 10 und 36 µg Epitestosteron (Dorfman, 1968) pro Tag mit dem Urin aus. Auch im Urin von Jungen finden sich je nach Alter nicht unerhebliche Mengen an Testosteron (Knorr, 1968).

## 2.2.5 Quellen und mögliche Eintragspfade von Androgenen in die Umwelt

### 2.2.5.1 Menschen

Menschliche Ausscheidungen und mit ihnen endogene und synthetische Steroidhormone menschlichen Ursprungs gelangen im besten Fall in Kläranlagen. Werden die Hormone dort nicht vollständig eliminiert, erreichen sie mit den gereinigten Abwässern die nachfolgenden Gewässer. In ungeklärten Abwässern waren Testosteron oder Testosteron-Äquivalente mit Konzentrationen von bis zu 9330 ng/L (Kirk et al., 2002; Leusch et al., 2006b) in deutlich größeren Mengen vorhanden als Östrogene (Shore et al., 1993a; Kirk et al., 2002; Leusch et al., 2006b). Auch in Abflüssen von Kläranlagen wurden noch Gehalte an Testosteron, Testosteronmetaboliten oder androgener Aktivität nachgewiesen (Tabelle 2.1). Die Eliminierungsrate in den Kläranlagen war dabei von der Art der Abwasserbehandlungen abhängig. Das Vorhandensein einer zweiten Klärstufe und insbesondere eine Abwasserreinigung mittels Belebtschlammverfahren reduzierten die Androgene bzw. die androgene Aktivität enorm (Tabak et al., 1981; Kirk et al., 2002; Thomas et al., 2002; Leusch et al., 2006b). Rein mechanische Klärung oder Tropfkörperanlagen (Thomas et al., 2002; Leusch et al., 2006b) waren dagegen weniger effektiv.

**Tab. 2.1: Nachweise von Androgenen oder androgener Aktivität in Abwässern von Kläranlagen**

Androgene	Androgene Aktivität	Quelle
	<113-4033 ng DHT/L	Kirk et al., 2002
Testosteron: bis 6,1 ng/L Androstendion: bis 4,5 ng/L		Kolodziej et al., 2003
	<6,5-2290 ng Teq/L	Leusch et al., 2006b
Testosteron: 0,2-0,5 nmol/L		Shore et al., 1993a
Testosteron: <0,01-0,02 µg/L Androsteron: Ø 3,82 µg/L Etiocholanolon: Ø 2,37 µg/L		Tabak et al., 1981
	<23-635 ng DHT/L	Thomas et al., 2002

DHT = Dihydrotestosteron-Äquivalente

Teq = Testosteron-Äquivalente

Des Weiteren wird anfallender Klärschlamm aus kommunalen Kläranlagen zum Teil landwirtschaftlich und auch landbaulich für z.B. devastierte Flächen wie Abraumhalden und Tagebauflächen verwertet. Von etwa 2,5 Mio. t Klärschlamm (TM), die in Deutschland jährlich anfallen, wurden 1998 etwa 1,7 Mio. t dieser stofflichen Verwertung zugeführt (Bilitewski et al., 2002), wobei die landwirtschaftliche Verbringung im Vordergrund steht. In Schleswig-Holstein wurden z.B. im Jahr 1999 über 80 % des angefallenen Klärschlammes – zwischen 70000 und 90000 t (TM) – auf landwirtschaftliche Flächen verbracht (Fehrenbach und Knappe, 2002). Über die Gehalte von natürlichen oder synthetischen Steroidhormonen im Klärschlamm und die Möglichkeit ihrer Versickerung oder Persistenz im Boden gibt es sehr wenige und meist einseitige, sprich Östrogenorientierte Untersuchungen. Holbrook et al. (2002) und Andersen et al. (2003) etwa wiesen im Klärschlamm östrogene Aktivitäten und Östrogene nach, die der Menge von 5-10 % bzw. 5 % des Eintrags aus den Kläranlagenzuflüssen entsprachen. Lorenzen et al. (2004) testeten in Kanada Klärschlammproben auf androgene, östrogene und gestagene Aktivität. Dabei konnten sowohl androgene (im Mittel 543 ng/g TM), als auch östrogene (im Mittel 1233 ng/g TM) Aktivität festgestellt werden, wenn keine aerobe Behandlung vorlag. In Proben aus Kläranlagen mit aerober Klärstufe wurden dagegen keine androgene und sehr geringe bis keine östrogene Aktivität nachgewiesen. Eine gestagene Aktivität wurde in keiner Probe festgestellt.

#### **2.2.5.2 Lebensmittelliefernde Tiere**

Aufgrund der immensen Populationsgrößen und der Art der Abproduktentsorgung sind lebensmittelliefernde Tiere eine bedeutende Quelle bezüglich der Kontamination von Umweltmedien mit Steroidhormonen. Die Exkremente landwirtschaftlicher Nutztiere enthalten Steroidhormone, die auch durch längere Lagerung nicht vollständig eliminiert werden (Schlenker et al., 1999a; Lorenzen et al., 2004; Hakk et al., 2005). Ihre Entsorgung erfolgt üblicherweise über das Verbringen der Gülle bzw. des Mistes als Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Flächen. Auf diese Weise gelangen Androgene in die Erde, von wo sie durch Abschwemmung bzw. Auswaschung bei Regenfällen benachbarte Oberflächengewässer erreichen (Shore et al., 1995; Finlay-Moore et al., 2000; Shore et al., 2004; Soto et al., 2004; Jenkins et al., 2006) oder durch Versickern ins Grundwasser gelangen können (Peterson et al., 2000; Kolodziej et al., 2004). Auch in Abflüssen von Weiden mit grasenden Rindern wurden nicht unerhebliche Androgenkonzentrationen gemessen (Shore et al., 2004; Jenkins et al., 2006) und bei

Weiden mit Zugang zu Flüssen oder Seen als Tränke ist auch eine direkte Kontamination des Wassers zu erwarten.

Zu Exkretionsmengen von Androgenen landwirtschaftlicher Tiere gibt es nur wenige Daten für Rinder, Schweine und Hühner (siehe Kapitel 2.2.4). Die Ausscheidungsmengen anderer lebensmittelliefernder Tiere und vor allem weiblicher Tiere sind praktisch unbekannt. Bekannt ist aber, dass auch weibliche Individuen Androgene synthetisieren und ausscheiden.

Choi (1987) wies im Blut von Fleckviehkühen  $650 \pm 71$  pg/ml Dehydroepiandrosteron,  $77 \pm 8$  pg/ml bis  $122 \pm 29$  pg/ml Androstendion, 160-243 pg/ml Epitestosteron und 46-96 pg/ml Testosteron nach. Kolodziej et al. (2004) fanden im Abprodukt-Sammelbecken einer Milchviehanlage Testosterongehalte von bis zu 100 ng/L und Lorenzen et al. (2004) wiesen mit einem Yeast Assay androgene Aktivitäten im Mist von Sauen und Milchkühen nach. Die höchsten Werte (1737 ng/g Trockengewicht) fanden sie im Dung von trächtigen, nicht laktierenden Kühen.

Eine Schätzung der Gesamtmenge an Androgenen, die durch die Nutztierhaltung produziert wird, ist somit eigentlich nicht möglich (Johnson et al., 2006). Lange et al. (2002) taten dies trotzdem unter alleiniger Berücksichtigung von männlichen Kälbern, Bullen, Ebern und Hühnern und kamen auf eine jährliche Menge von 7,1 Tonnen in Europa bzw. 4,4 Tonnen in den USA. Diese Werte müssen deutlich unter den realen Werten liegen, da somit nach Lange et al. (2002) ca. 300 Mio. Tiere in Europa und ca. 150 Mio. Tiere in den USA unberücksichtigt blieben.

Neben den natürlichen Androgenen stellen synthetische, wie das Mastmittel Trenbolon, eine weitere Verunreinigung der Umwelt mit androgen wirksamen Stoffen dar. So waren androgene Aktivitäten und Trenbolongehalte zwischen 10 und 120 ng/L im Elkhorn River, USA, auf Abflüsse einer Rindermastanlage zurückzuführen (Orlando et al., 2004; Soto et al., 2004; Durhan et al., 2006). Trenbolon ist sehr stabil in flüssigem (nach ca. 8,5 Monaten noch 50 % des Anfangsgehaltes nachweisbar) und festem Dung (nach 4,5 Monaten noch bis zu 10 ng/g). In der Erde von Feldern, die mit Dung von behandelten Rindern fertilisiert wurden, konnte noch 56 Tage später Trenbolon nachgewiesen werden (Schiffer et al., 2001). Van der Merwe und Pieterse (1994) bestätigten die Stabilität im Urin bei einer Lagerung bei 26 C, konnten allerdings einen rapiden Abfall des Trenbolongehalts feststellen, wenn der Urin der prallen Sonne ausgesetzt war.

### **2.2.5.3 Fischwirtschaft**

In Abflüssen von Fischzuchten wurden Östradiol, Testosteron und Androsteron in Konzentrationen von bis zu 10 ng/L nachgewiesen und stellen somit eine weitere Kontaminationsquelle von Gewässern mit Steroidhormonen dar (Kolodziej et al., 2004; Shore et al., 2004; Barel-Cohen et al., 2006).

Darüber hinaus werden laut Nikov und Smolka (2003) in der Aquakulturproduktion über 300 chemische und biologische Substanzen, darunter Antibiotika, Pestizide, Desinfektionsmittel und auch Hormone, eingesetzt. 15 Stoffe konnten identifiziert werden, die als endokrine Disruptoren gelten, u.a. Tributylzinn. Auch Murai et al. (2005) konnten in Japan in Gewässern mit vorherrschend Aquakultur deutlich höhere oder ähnliche Konzentrationen von Butylzinnverbindungen im Vergleich zu Gewässern mit großer Schwerindustrie feststellen.

Gemäß der Richtlinie 96/22/EG ist in Europa die Verabreichung von Stoffen mit hormoneller Wirkung an Tiere der Aquakultur ausschließlich zur sexuellen Inversion der Setzlinge innerhalb der ersten drei Monate mit dafür zugelassenen Stoffen erlaubt. Europas Anteil an der globalen Produktionsmenge von knapp 46 Mio. Tonnen ist aber gering (4,4 %). Über 90 % der globalen Produktion findet in Asien statt. Hauptproduzent weltweit ist China mit einem Produktionsvolumen von 32.4 Millionen Tonnen. Die Aquakulturproduktion ist dabei der im Lebensmittelbereich am schnellsten wachsende Sektor, wobei das Hauptwachstum in den Entwicklungsländern erwartet wird (Nikov und Smolka, 2003).

### **2.2.6 Vorkommen von Androgenen bzw. androgen wirksamen Substanzen in Gewässern**

Auch wenn die Anzahl der Untersuchungen zum Vorkommen von Androgenen in Gewässern eher begrenzt ist, zeigen die Ergebnisse aus Israel, England, Singapur und den USA durchaus, dass eine Kontamination besteht. So konnten etwa Shore et al. (2004) in 76 % der Proben aus dem oberen Jordan Testosteron mit Mittelwerten von  $1,5 \pm 0,4$  ng/L (1. Regenperiode) und  $0,8 \pm 0,5$  ng/L (2. Regenperiode) nachweisen. Barel-Cohen et al. (2006) fanden im unteren Jordan über den gesamten untersuchten Flussverlauf (etwa 100 km) messbare Testosterongehalte mit Werten von 3,3 ng/L am Ursprung des Flusses und 4,8 ng/L zwischen Kilometer 67 und 100. Verschiedene Zuflüsse des Jordan enthielten im Mittel 2,7 ng/L (Mai) und 3,8 ng/L (Okt) Testosteron. In einem umfangreicher untersuchten Zufluß wurden Werte zwischen 0,4 und > 40 ng/L gemessen.

Thomas et al. (2002) fanden in England im Oberflächenwasser verschiedener Flussmündungen androgene Aktivitäten zwischen <2 bis 9 ng DHT (Dihydrotestosteron-Äquivalente)/L, wobei die meisten Proben aber unter der Nachweisgrenze von <2 ng DHT/L lagen. Deutlich höhere Werte stellten Thomas et al. (2002) im Sedimentporenwasser (<45 bis 187 ng DHT/L) und im Sediment selber fest (1020-15300 ng DHT/kg in 10 von 41 Proben). Sie identifizierten Androstendion, Androstandion, Dehydrotestosteron und Androsteron und Epiandrosteron, die zu 36 %, 33 %, 15 % und 14 % für die androgene Aktivität verantwortlich waren.

In den umgebenden Küstengewässern Singapurs enthielten alle Wasserproben eine basale androgene Aktivität (Gong et al., 2003). Je geschützter dabei die Probenstellen lagen und somit weniger den Gezeiten ausgesetzt, desto höher, und je weiter die Probenstellen von der Küstenlinie entfernt waren, desto geringer war die androgene Aktivität. Die höchsten gefundenen androgenen Aktivitäten entsprachen etwa 3 % derer von 0,1 nM DHT (Dihydrotestosteron). In einer Folgeuntersuchung an Muscheln (*Perna viridis*) aus diesem Gebiet fanden Bayen et al. (2004) relativ geringe androgene Aktivitäten im Muschelgewebe (< 1 % von 0,1 nM DHT), die in Anwesenheit von DHT aber auf 112-340 % anstiegen, wobei die Stärke des Anstiegs eine signifikant positive Korrelation zum Gehalt an persistenten organischen Schadstoffen (POP) aufwies. Auch Gong et al. (2003) stellten bei Anwesenheit von DHT eine sprunghafte Erhöhung der androgenen Aktivität der Wasserproben auf 200 bis 900 % von 0,1 nM DHT fest. Diesen mehr als additiven Effekt in einem Stoffgemisch, das eine höhere hormonelle Aktivität aufzeigt, als die Summe der einzelnen Stoffe es erwarten ließe, stellten auch Rajapakse et al. (2002) und Silva et al. (2002) fest.

In den USA führten Kolpin et al. (2002) umfangreiche Untersuchungen zur Belastung von Flüssen mit organischen Schadstoffen aus Abwässern durch. In etwa 40 % der Proben wurden dabei Geschlechtshormone nachgewiesen; Testosteron kam in 2,8 % der Proben vor mit einem mittleren Gehalt von 116 ng/L. Kolodziej et al. (2003) wiesen in einem einer Kläranlage nachgeschalteten Wassersystem, bestehend aus mehreren miteinander verbundenen Teichen, bis zu 0,8 ng/L Testosteron nach und im Wasser von Flüssen, die Abflüsse aus Rindermastanlagen erhielten oder an Felder grenzten, die mit Mist aus diesen Anlagen fertilisiert wurden, wies man androgene Aktivitäten und auch Trenbolon und seine Metabolite nach (Soto et al., 2004; Durhan et al., 2006).

Kolodziej et al. (2003) fanden in einem urbanen Gebiet 17 $\beta$ -Östradiol, Östron und Testosteron in einem Grundwasserbrunnen. Auch in Israel wurde Testosteron in Brunnenwasser und im See Genezareth, der u.a. als Trinkwasserreservoir dient,



nachgewiesen (Shore et al., 1993a; Barel-Cohen et al., 2006) und die Untersuchung von Quellwasser des oberen Jordans ergab bei zwei Proben Testosterongehalte von 1,7 ng/L und 2,5 ng/L (Shore et al., 2004).

### **2.2.7 Auswirkungen von Androgenen bzw. androgen wirksamen Substanzen auf die Umwelt**

Neben den populären Beispielen wie Tributylzinn und den Abwässern der papierherstellenden Industrie gibt es kaum Untersuchungen zu Auswirkungen auf Wildtiere durch androgen wirksame Stoffe, was seinen Grund sicherlich in der bisher sehr einseitigen Gewichtung des Forscherdrangs auf Östrogene und Xenoöstrogene in der Umwelt hat. Die nachfolgenden Beispiele zeigen allerdings, dass Androgene menschlichen und tierischen Ursprungs Effekte bei Fischen hervorrufen.

Leusch et al. (2006a) fanden bei wildlebenden männlichen adulten Moskitofischen (*Gambusia holbrooki*) unterhalb einer Kläranlage, deren Abflüsse etwa 2 µg/L Testosteron-Äquivalente enthielten, deutlich längere Gonopodien im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Entwicklung der Gonopodien erfolgt durch androgene Stimulation der Hoden (Turner, 1941). Ein vergrößertes Verhältnis von 4. zu 6. Strahl der Afterflosse, ein Zeichen androgener Einflüsse (Angus et al., 2001), zeigte sich sowohl bei männlichen wie auch bei weiblichen Tieren. Ebenso flussabwärts einer städtischen Kläranlage zeigten männliche *Gambusia affinis* verlängerte Gonopodien und vergrößerte Hoden (Angus et al., 2002).

Matthiessen et al. (2002) wiesen in Nieren von Stichlingsweibchen, die 7 Wochen im Fluss Tee (England) in Käfigen gehalten wurden, leicht erhöhte Spigginkonzentrationen nach; ein Kleisterprotein, das männliche Stichlinge für den Nestbau während der Brutzeit produzieren. Die Produktion bei weiblichen Stichlingen ist mit der Behandlung von Androgenen induzierbar und stellt somit einen möglichen Indikator androgener Kontaminationen von Gewässern dar (Katsiadaki et al., 2002). Hill et al. (2010) untersuchten den Einfluss von Klärwerksabflüssen auf unreife, weibliche Regenbogenforellen und wiesen nach 10 Tagen Exposition neben erhöhten Vitellogeninspiegeln östrogene, androgene und antiandrogene Aktivitäten in deren Gallenflüssigkeit nach. Trotzdem in den Abflüssen keine androgenen Aktivitäten nachweisbar waren, waren sie in der Galle in Form von Testosteron und Testosteronmetaboliten präsent.

Im Elkhorn River, USA, der mit Abflüssen einer Mastviehanlage belastet war, in der Mastförderer eingesetzt wurden, wurden zum Einen eine deutliche androgene Aktivität im

Wasser und zum Anderen Veränderungen von Hormonspiegeln und morphologischen Merkmalen bei wildlebenden Fettkopfbrassen festgestellt (Orlando et al., 2004). Trenbolon- $\beta$  kann bei männlichen Fettkopfbrassen die Synthese und/oder Freilassung von GnRH und/oder GtH unterdrücken, was zu den bei den männlichen Tieren beobachteten Merkmalen, wie verringerte Testosteronsynthese, Hodengröße und Interokular-Distanz führt (Ankley et al. 2003).

Äußerst interessant ist die Feststellung, dass Androgene bei manchen Fischarten offensichtlich einen östrogenen Effekt erzielen. Diese Erscheinungen könnten auf einer Bindung von Androgenen an den Östrogen-Rezeptor (ER) oder auf der Aromatisierung zu einem Östrogen beruhen.

Nimrod und Benson (1997) etwa zeigten, dass Testosteron an den ER des Katzenwelses bindet. Auch die Bindung von Trenbolon an den ER von Fettkopfbrassen und Regenbogenforellen wurde nachgewiesen (Le Guevel und Pakdel, 2001; Ankley et al., 2003). Bei männlichen Fettkopfbrassen waren erhöhte Spiegel an Östradiol und Vitellogenin die Folge (Ankley et al., 2003).

Ebenso konnte durch die Exposition mit Methyltestosteron ein Vitellogeninanstieg bei männlichen Fettkopfbrassen erzeugt werden (Zerulla, 2001; Pawlowski et al., 2004a), der nach den Untersuchungen von Zerulla (2001) und Hornung et al. (2004) mit der Aromatisierung des Methyltestosterons zu Methylöstradiol begründbar ist.

Auch kultivierte Hepatozyten aus immaturren Regenbogenforellen wurden durch eine Androgenexposition zur Vitellogeninsynthese angeregt (Mori et al., 1998) und bei Goldfischen (*Carassius auratus*) induzierte man die Vitellogeninsynthese mit Hilfe einer methyltestosteronhaltigen Diät (Hori et al., 1979).

Diese Erkenntnisse zeigen wiederum die Komplexität des hormonellen Systems auf und bieten neue Diskussionsansätze für Studien über Verweiblichungen von Fischen, die auf der Feststellung von erhöhten Vitellogeninspiegeln als sehr populärem Bioindikator beruhen.

Kolodziej et al. (2003) heben außerdem die mögliche pheromone Wirkung exogener Hormone auf das Fortpflanzungsverhalten von Fischen hervor. Pheromone sind Stoffe oder Stoffgemische, die von einem Individuum abgegeben werden und bei anderen Individuen der gleichen Art ganz spezifische Verhaltensweisen auslösen (Döcke und Hoedemaker, 2000). Viele Fische nutzen diesen Weg der Kommunikation während der Laichzeit, was in Änderungen des Verhaltens und physiologischer Parameter resultiert (Sorensen und Stacey, 1999). Das Ansprechen auf pheromone Reize zur falschen Zeit

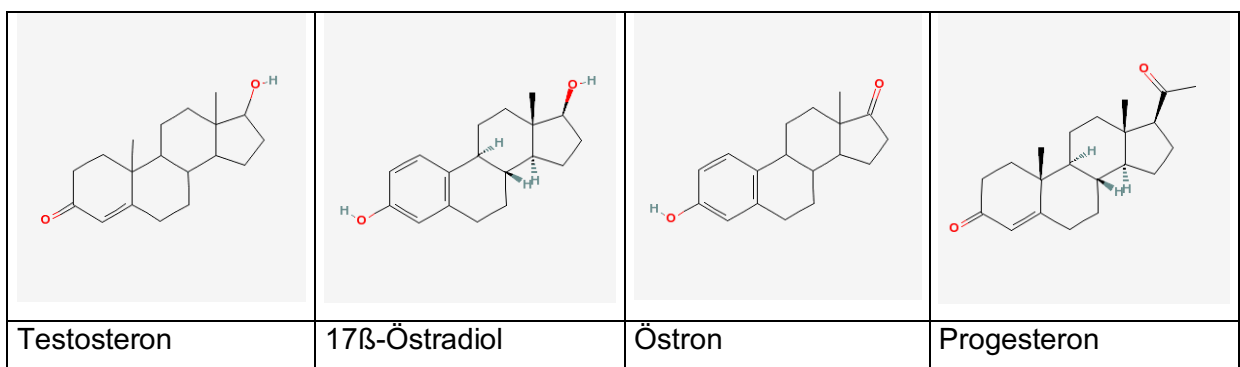
vergeudet viel Energie, lenkt von der Nahrungsaufnahme ab und kann das Risiko gefressen zu werden erhöhen (Defraipont und Sorensen, 1993).

Die in Gewässern festgestellten Androgenkonzentrationen können durchaus einen solchen Effekt hervorrufen. Testosteron wirkt bei Meerneunaugen ab 3 ng/L als Pheromon (Adams et al., 1987). Androstendion entfaltet ebenfalls pheromone Wirkung in pikomolaren Konzentrationen beim Goldfisch (Sorensen und Stacey, 1999) und der Atlantische Lachs nimmt Testosteron bereits ab 0,003 ng/L olfaktorisch wahr (Moore und Scott, 1991).

### 2.3 Stabilität von Androgenen in der Umwelt

Steroidhormone tierischen und menschlichen Ursprungs gelangen direkt oder mit Abwässern aus Kläranlagen in Oberflächengewässer und mit Gülle, Mist oder Klärschlamm auf und in Böden, von wo sie bei Regenfällen wiederum in benachbarte Gewässer abgespült werden oder im Boden versickern und so das Grundwasser erreichen können. Um die Verbreitung, Persistenz und ökologische Relevanz von Steroidhormonen abschätzen zu können, ist es also entscheidend, die Sorptions- und Transformationsprozesse, denen Steroide in diesen Umweltmedien ausgesetzt sind, zu charakterisieren.

Bei den Steroiden handelt es sich um komplexe organische, hydrophobe Verbindungen (s. Abb. 2.2). Nach der systematisch-chemischen Nomenklatur leiten sich die Steroide von dem Gonan bzw. Steran ab, einem tetrazyklischen, gesättigten Kohlenwasserstoff, der 17 Kohlenstoff-Atome enthält. Die Zerstörung der steroidal Form kann durch Sonneneinwirkung (Photodegradation) und Mikroorganismen (Biodegradation) erfolgen.



**Abb. 2.2: Strukturformeln von Testosteron, 17β-Östradiol, Östron und Progesteron**

### 2.3.1 Photodegradation von Steroidhormonen

Zuo et al. (2006), die  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol, Östron und  $17\beta$ -Östradiol in der Mündung des Acushnet River in Massachusetts nachwiesen, beschreiben für  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol eine rapide Photodegradation mit einer Halbwertszeit von unter 1,5 Tagen an sonnigen Frühlingstagen und eine gleichzeitige Persistenz gegenüber mikrobieller Degradation. Auch Jürgens et al. (2002) konnten für Ethinylöstradiol und  $17\beta$ -Östradiol neben der Biodegradation auch eine Empfindlichkeit gegenüber Photodegradation feststellen. Unter idealen Bedingungen ermittelten sie Halbwertszeiten von 10 Tagen.

Wie schon weiter oben beschrieben stellten van der Merwe und Pieterse (1994) innerhalb von 2 Tagen einen fast vollständigen Abfall des Trenbolongehalts einer Rinderurinprobe in der prallen Sonne fest. Ebenso fiel die Konzentration an  $17\alpha$ -19-Nortestosteron bei Sonneneinwirkung ab, wohingegen Zeranol, ein synthetisches Östrogen, über den Versuchszeitraum von 10 Tagen stabil blieb.

Zhang et al. (2007) konnten in UV-Photo-Reaktoren Östron und  $17\beta$ -Östradiol innerhalb von 4 Stunden und mit kürzeren Wellenlängen sogar in einer Stunde degradieren. Die Degradationsrate war dabei abhängig von der Präsenz an Huminsäure, die die Degradationsrate erhöhte, und vom pH-Wert mit einem Optimum bei 7,6, das sich mit dem von Liu und Liu (2004) ermittelten pH-Optimum von 8 deckt. Vulliet et al. (2010) untersuchten die Photodegradation von Testosteron unter Laborbedingungen. Sie stellten bei einer Wellenlänge von 313 nm, die einer natürlichen Sonneneinstrahlung entspricht, eine Reduktion des Testosterons um 90 % nach etwa 11 Stunden fest.

### 2.3.2 Mikrobielle Degradation von Steroidhormonen

Verschiedene Mikroorganismen sind in der Lage, Transformationen am Sterangerüst und dessen Seitenketten vorzunehmen (Fujii et al., 2002, 2003; Yoshimoto et al., 2004). Einige Mikroorganismen können im Boden vorhandene Steroide und Steroidanaloga als einzige Kohlenstoffquelle nutzen (Talalay et al., 1952) und deren energiereiche Ringsysteme mit einer Vielzahl von Enzymen bis zur Bildung ringfreier Karbonsäuren und  $\text{CO}_2$  vollständig abbauen (Schubert et al., 1969; s. Abb. 2.3).

Die  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase ( $3\alpha$ -HSD) initiiert als eines der ersten und zentralen Enzyme den steroidalen Abbauweg durch die Oxidierung der 3-Hydroxylgruppe am A-Ring (Marcus und Talalay, 1956). Sie wurde z.B. in *Comamonas testosteroni* (Boyer et al., 1965; Oppermann und Maser, 1996), in *Clostridium perfringens* (MacDonald et al., 1976), in *Eubacterium* species (MacDonald et al., 1979; Mallonee et al., 1995) und

*Pseudomonas putida* (Uwajima et al., 1978), alles ubiquitär in Böden und Gewässern vorkommende Umweltkeime, identifiziert.

Im Gegensatz zu Östradiol und seinem Hauptmetaboliten Östron, zu deren Degradationsmechanismen bisher nur wenig bekannt ist, ist die Degradation von Testosteron durch das Bakterium *Comamonas testosteroni* sehr detailliert erforscht (Talalay et al., 1952; Horinouchi et al., 2004).

Hier erfolgt nach der Oxidierung der 3-Hydroxylgruppe am A-Ring die Aromatisierung des A-Rings und die dadurch ermöglichte Öffnung des B-Rings unter der Bildung von sogenannten Secosteroiden (Leppik und Sinden, 1987). Am nun aromatischen Ring A erfolgt eine weitere Hydroxylierung und die anschließende Spaltung des A-Rings, wodurch ein Diseco-Steroid entsteht (Leppik, 1989).

Die verbleibenden Reste am Ring A werden durch eine Lyase abgetrennt, wobei Brenztraubensäure und Propionaldehyd entstehen (Coulter und Talalay, 1968). Diese werden zur Energiegewinnung in den Citratzyklus eingebracht. Die Spaltprodukte der Ringe B, C und D bilden Bernsteinsäure, Lävulinsäure und CO<sub>2</sub> (Schubert et al. 1968; Leppik, 1989).

*Comamonas testosteroni* ist in der Lage C19- und C21-Steroide und auch polychlorierte Biphenyle (PCB) und andere aromatische Kohlenwasserstoffe zu metabolisieren (Bergeron et al., 1994; Horinouchi et al., 2003), dabei unterliegt die Expressierung der steroidabbauenden Enzyme einer Induktion durch die Substrate selbst (Horinouchi et al., 2003).

Fujii et al. (2002) und Yoshimoto et al. (2004) konnten aus Belebtschlamm von einem Klärwerk Bakterienarten isolieren, die Östrogene in Reinkulturen biodegradieren können. Schlenker et al. (1999b) testeten den Einfluss von *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* auf Östron durch in-vitro-Versuche. Bei *Clostridium perfringens* deutete sich eine mikrobiell-enzymatische Metabolisierung des Östrons an, bei den Ansätzen mit *Escherichia coli* nicht.

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.

Lindemann (2005) inkubierte Bakterien-Reinkulturen von *Escherichia coli* und *Aeromonas sobria* mit Progesteron. Es konnte keine Reduktion des Progesterons herbeigeführt werden.

Lai et al. (2002) konnten nachweisen, dass *Chlorella vulgaris*, eine Frischwasseralge, Östradiol in Östron und einen weiteren unbekanntem Metaboliten umwandeln kann.

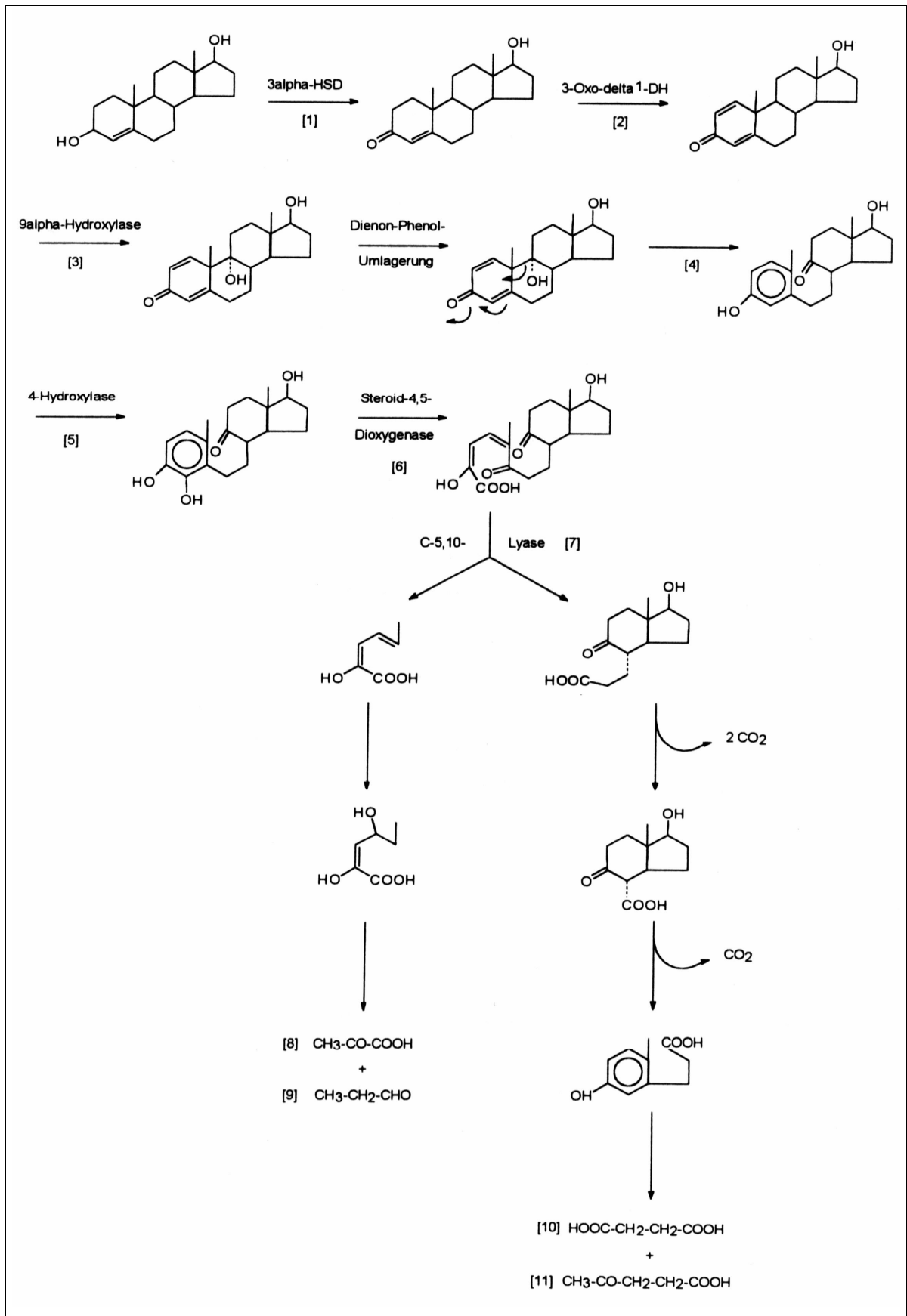


Abb. 2.3: Vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus (Träger, 1977)

Der Nachweis von der Fähigkeit einzelner Bakterien- oder Algenarten, Steroide vollständig abzubauen ist aus umwelttechnischer Sicht höchst interessant, da diese z.B. bei der Aufbereitung von mit langlebigen Steroidverbindungen kontaminierten Böden und Gewässern gezielt eingesetzt werden könnten.

Für die Beurteilung einer Umweltsituation ist dies allerdings weniger geeignet, da hier komplexe Interaktionen innerhalb der Biozönose der Mikroorganismen ablaufen und durchaus ein Kometabolismus erwartet werden kann.

### **2.3.2.1 Biodegradation von Steroidhormonen im Oberflächenwasser**

In Gewässern bilden Produzenten von Biomasse, wie Algen und Wasserpflanzen, Konsumenten, wie Fische, Krebse und Insekten, und Mikroorganismen als Destruenten zusammen eine Biozönose. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen, zu denen Bakterien, Mikroalgen, Pilze, Protozoen und Viren gehören, variiert nicht nur in den verschiedenen Gewässern, sondern kann sich auch innerhalb eines Gewässers unterscheiden. So finden sich z.B. im Sediment aufgrund der oft anaeroben Verhältnisse obligat anaerobe Bakterien und an der Wasseroberfläche kann der Bakteriengehalt 10- bis 100-fach höher sein als in der darunter liegenden Wassersäule (Atlas und Bartha, 1998). Der Anteil an Mikroorganismen ist u.a. abhängig von Nährstoffangebot, Sauerstoffgehalt, Temperatur, Lichteinfall und eventuellen Abwasserbelastungen.

Erfolgt eine Belastung mit organischen Stoffen, vermehren sich zunächst Mikroorganismen, die diese Stoffe aufnehmen und abbauen; sogenannte Saprobier (Müller und Schlenker, 2003). Das Ausmaß der Bakterienaktivität, also der Biodegradation, kann von verschiedenen Parametern, wie pH-Wert, der Anwesenheit von alternativen oder konkurrierenden Substanzen und Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst werden (Swannell et al., 1995; Das et al., 2004). Einen besonderen Einfluss scheint die Umgebungstemperatur auf die Metabolisierungsrate zu haben. Tabak et al. (1981) stellten für alle untersuchten synthetischen und natürlichen Hormone eine geringere Abbaurrate in Kläranlagen im Winter fest. Giese (2004) sowie Giese et al. (2007) untersuchten die Degradation von  $17\beta$ -Östradiol und Östron im Flusswasser bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei wurde die untere Nachweisgrenze von Östron bei 30 °C in 2 bis 14 Tagen, bei 20 °C in 6 bis 14 Tagen und bei 5 °C in 21 bis 56 Tagen erreicht. Die  $17\beta$ -Östradiolkonzentration wurde bei 20 °C nach 4 bis 12 Tagen um über 90 % reduziert. Jürgens et al. (2002) entnahmen Flusswasser aus einer ähnlichen Tiefe (ca. 0,5 m) wie Giese (2004) und lagerten die Ansätze mit  $17\beta$ -Östradiol.  $17\beta$ -Östradiol wurde bei 20 °C mit einer Halbwertszeit von 0,2 bis 9 Tagen zu Östron abgebaut, welches wiederum in

ähnlicher Zeit weiter abgebaut wurde. Betrug die Lagerungstemperatur nur 10 °C, dauerte der Abbau ungefähr doppelt so lange. Wegener et al. (1999) fügten Wasser, das aus dem Ablauf einer Kläranlage stammte, 17 $\beta$ -Östradiol zu, das bei 20 °C innerhalb von 7 bis 8 Tagen vollständig abgebaut wurde. Sie ermittelten für Östrogene eine Halbwertszeit von 2 bis 6 Tagen in einem Fluss.

Lindemann (2005) konnte für Progesteron im Flusswasser eine deutlich schnellere Degradation bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C gegenüber 5 °C feststellen. Hier waren bereits nach einem Tag mehr als 90 % abgebaut. Bei 5 °C wurde eine vergleichbar niedrige Konzentration ca. am 6. Tag erreicht.

Barel-Cohen et al. (2006) untersuchten den unteren Jordan River auf einer Länge von 100 km auf den Gehalt von Testosteron und anderen Steroidhormonen. Auf den ersten 25 km fielen die Hormonkonzentrationen auf die Hälfte ihrer Maximalwerte (Testosteron: 3,3 ng/L; Östradiol + Östron: 2,4 ng/L) ab. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 m/s wäre die Strecke von 25 km nach ca. 35 Stunden bewältigt, was somit einer Halbwertszeit von 35 h entspräche. Für die Abnahme der Hormonkonzentrationen im Flusswasser schreiben Barel-Cohen et al. (2006) bakterielle, adsorptive oder photolytische Prozesse verantwortlich. Bradley et al. (2009) untersuchten die Fähigkeit von Sediment-Wasser-Gemischen verschiedener Flüsse, die Abwässer von Kläranlagen erhalten, Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol und Östron abzubauen. Für Testosteron stellten sie bei 23 °C Abbauraten bis zu 30 % pro Tag fest. Flussabwärts der Abwasserzuläufe war der Abbau deutlich verringert. Kolodziej et al. (2003) konnten im finalen Abfluss eines Wassersystems, das einer Kläranlage nachgeschaltet war und das die Abwässer in etwa 7 Tagen durchfließen, keine deutliche Reduzierung des Testosterongehalts ermitteln.

### **2.3.2.2 Biodegradation von Steroidhormonen im Boden**

Lee et al. (2003) untersuchten den Abbau von Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol und 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol in verschiedenen Erd/Sediment-Wasser-Gemischen bei Raumtemperatur. Die Geschwindigkeit des Abbaus variierte dabei zwischen den verschiedenen Erdtypen. So war die Hälfte des Testosterons in 0,3 bis 7,3 Tagen abgebaut. Für 17 $\beta$ -Östradiol wurden Halbwertszeiten von 0,8 bis 9,7 Tagen und für 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol von 3,1 bis 9,6 Tagen festgestellt. Je höher der Gehalt an organischem Kohlenstoff war, desto schneller erfolgte der Abbau. Die längsten Halbwertszeiten lagen im Sediment-Wasser-Gemisch vor, das den geringsten Gehalt an organischem Kohlenstoff und den höchsten Anteil an Sand hatte (Lee et al., 2003).



Stumpe und Marschner (2007), die u.a. die Mineralisierung von Testosteron und 17 $\beta$ -Östradiol in verschiedenen Böden über einen Zeitraum von 23 Tagen untersuchten, zeigten, dass Testosteron in allen Erdproben schneller und auch insgesamt zu größeren Teilen abgebaut wurde als 17 $\beta$ -Östradiol (Tag 23: 50,6 - 59 % Testosteron; 5,1 - 7,4 % 17 $\beta$ -Östradiol). Die Mineralisationskurven zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede, so verlief der Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol kontinuierlich und linear, der des Testosterons dagegen in den ersten drei Tagen exponentiell mit anschließendem starken Abfall der Abbaurate, woraufhin kaum noch eine Mineralisation bis zum Ende des Versuchs stattfand. Stumpe und Marschner (2007) begründen den schnelleren Abbau von Testosteron im Vergleich zu 17 $\beta$ -Östradiol in der unterschiedlichen Struktur des A-Ringes. Testosteron besitzt hier nur eine Doppelbindung und ist somit weniger resistent gegenüber einer mikrobiellen Degradation.

Auch Casey et al. (2004) und Jacobsen et al. (2005) stellten in der Erde einen deutlich schnelleren Abbau von Testosteron als von 17 $\beta$ -Östradiol fest, wobei der Abbau von Testosteron durch die Zugabe von Schweinegülle oder Klärschlamm gehemmt, der Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol aber beschleunigt wurde (Jacobsen et al., 2005).

Ebenso wiesen Casey et al. (2004) im Eluat von verschiedenen Erdsäulen (7,5 % und 9,2 % organischer Kohlenstoff) Testosteron und/oder Testosteronmetabolite nach, wohingegen im Eluat von Sand (0 % organischer Kohlenstoff) und einer Lehmart (5,3 % organischer Kohlenstoff) ausschließlich Testosteron festgestellt wurde, was die von Lee et al. (2003) festgestellte Abhängigkeit der mikrobiellen Abbaurate vom Gehalt an organischem Kohlenstoff bestätigt.

Weitere Faktoren stellen das Nährstoffangebot, die Temperatur und die Bodenfeuchte dar. Das et al. (2004) zeigten, dass die Degradation von Testosteron und 17 $\beta$ -Östradiol im Boden mit der Verringerung an Nährstoffen ab- und nach Zufuhr dieser wieder zunimmt. Lorenzen et al. (2005) konnten bei 30 C in verschiedenen Böden und bei unterschiedlichen Feuchten nach 24 Stunden kein Testosteron mehr nachweisen, dagegen blieb die Testosteronkonzentration in luftgetrockneter Erde bis zum Versuchsende (120 Stunden) konstant. In den Untersuchungen von Jacobsen et al. (2005) waren bei Umgebungstemperaturen von 4 C und 12 C noch nach 96 Stunden Testosteron und Metabolite im Boden nachweisbar, wohingegen bei 30 C bereits nach 24 Stunden weder Testosteron, noch Transformationsprodukte auffindbar waren.

Gegen die im Labor ermittelten relativ schnellen Abbauraten von Testosteron sprechen die Ergebnisse aus Feldversuchen, bei denen noch 80 Tage nach dem Verbringen von Hähnchenmist auf Weideland 50-70 ng/L Testosteron im abfließenden Wasser nachgewiesen werden konnten (Finlay-Moore et al., 2000).

Als Hauptmetaboliten werden von Testosteron Androstendion und von  $17\beta$ -Östradiol Östron identifiziert (Lee et al., 2003; Das et al., 2004; Jacobsen et al., 2005; Lorenzen et al., 2005). Lee et al. (2003), Casey et al. (2004) und Das et al. (2004) können noch einen weiteren, nicht identifizierten Testosteronmetaboliten nachweisen und Jacobsen et al. (2005) und Lorenzen et al. (2005) identifizieren neben Androstendion noch  $5\alpha$ -Androstan-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion als Transformationsprodukte von Testosteron mit androgenen Potenzen im Vergleich zu Testosteron von 20 % für Androstendion, 80 % für Androstandion und 3 % für Androstadiendion (Lorenzen et al., 2005).

### **2.3.3 Sorptionsverhalten von Steroidhormonen**

Es ist aufgrund ihrer Hydrophobie zu erwarten, dass Steroidhormone in Gewässern dazu neigen, am Sediment zu binden, was die Ergebnisse von Thomas et al. (2002) bestätigen. Die nachgewiesenen Androgenkonzentrationen von 1020 - 15300 ng DHT/kg im Sediment, < 45 bis 187 ng DHT/L im Sedimentporenwasser und < 2 bis 9 ng DHT/L im Flusswasser demonstrieren dies deutlich.

Casey et al. (2004) beobachteten in Erd-Wasser-Gemischen, dass die Testosteronkonzentration in der wässrigen Phase zunächst innerhalb der ersten 5 Stunden abnahm und dann mit der Zeit wieder anstieg. Für die Gründe des Konzentrationsanstiegs kommen Desorption oder die Anwesenheit von Metaboliten, die um die Sorptionsplätze konkurrieren oder eine geringere Sorptionsaffinität haben, in Frage. Lai et al. (2000) stellten in Anwesenheit von Sediment ähnliche Sorptionsparameter für Östrogene fest. Hier erfolgte zuerst eine rasche Adsorption und nach etwa einer Stunde eine langsame Desorption. Die Adsorption von Östrogenen konnte durch mehr Sediment, mehr organischen Kohlenstoff und höheren Salzgehalt verstärkt werden.

In der Erde zeigt  $17\beta$ -Östradiol ein stärkeres Sorptionsverhalten als Testosteron (Sangsupan et al., 2006; Stumpe und Marschner, 2007). In den Untersuchungen von Casey et al. (2004) konnte Testosteron die Erdsäule intakt durchfließen und war im Eluat nachzuweisen. In vergleichbaren Versuchen konnte dagegen kein  $17\beta$ -Östradiol im Eluat gefunden werden (Bilitewski et al., 2002; Casey et al., 2003).

Im oberen Jordan River stellten Shore et al. (2004) nach Regenfällen erhöhte Testosteron- und Östrogenkonzentrationen bis zu 6 ng/L fest, die innerhalb eines Zeitraums von 3 Monaten auf Werte unter 0,3 ng/L abklagen. Shore et al. (2004) führen dies auf Abflüsse von Fischzuchten und oberflächliche Abspülungen von benachbarten Rinderweiden zurück. Spätere Testosteronpeaks, die ohne messbare Östrogengehalte

einhergehen und eine Korrelation zu erhöhten Sulfat- und Phosphormengen aufwiesen, die dem Torfboden entstammten, begründeten Shore et al. (2004) in der Anreicherung des Testosterons in der Erde, das im Gegensatz zu Östrogenen, die fest an Erdbestandteile gebunden sind, durch Regenfälle ausgespült werden kann. Casey et al. (2004) sehen das Risiko, dass Testosteron in tiefere Schichten vordringen kann, wo die Biodegradationsraten reduziert sind, und so die Möglichkeit von Persistenz und auch Grundwasserkontamination zunimmt.

Die Stärke der Adsorption von Östradiol und Testosteron ist besonders von dem Gehalt an organischem Kohlenstoff abhängig. Je höher dieser ist, desto stärker ist die Adsorption (Lai et al., 2000; Lee et al., 2003; Casey et al., 2004). Dabei bindet der Großteil der Hormone (ca. 50 %) in den oberen 10 cm des Bodens (Casey et al., 2003, 2004; Sangsupan et al., 2006). Mit der Erdtiefe nimmt die Adsorption signifikant ab (Casey et al., 2004; Sangsupan et al., 2006), wie auch der Gehalt an organischem Kohlenstoff mit der Tiefe abnimmt (Sangsupan et al., 2006).

Sangsupan et al. (2006) stellten fest, dass Hormone stärker in konventionell agrarisch bearbeiteten Böden gebunden sind, als in naturbelassenen. Sie vermuten den Grund im höheren Lehmgehalt der obersten Schicht von bearbeiteten Böden. Ebenso führen sie an, dass der höhere Grad an Struktur und das Vorhandensein von kontinuierlichen Makroporen in naturbelassener Erde einen ersten Durchfluss von Hormonen bis tief in die Erde ermöglichen können. Die agrarische Bearbeitung von Böden zerstört diese natürliche Struktur und macht den Boden für Wasser undurchlässiger, wodurch ein Transport von Hormonen in tiefere Bodenschichten erschwert und somit wiederum eine Abschwemmung begünstigt wird.

## **2.4 Tests**

### **2.4.1 Nachweis von androgener Aktivität**

Will man Hormone oder hormonell wirksame Substanzen nachweisen, gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen kann die hormonelle Wirksamkeit mit Hilfe biologischer Testsysteme (Bioassays) ermittelt werden. Dies ist besonders bei Umweltproben ratsam, da hier oft ein Stoffgemisch vorliegt, das in seiner Gesamtheit eine höhere hormonelle Aktivität aufzeigt, als die Summe der Effekte der einzelnen Stoffe es erwarten ließe (Silva et al., 2002). Man unterscheidet zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*- Methoden.

Bei den *in-vitro*-Methoden wird die hormonelle Wirkung an isolierten Zellsystemen getestet. Im Gegensatz zu zahlreichen Testsystemen für die Erfassung östrogenen

Aktivität, gibt es noch relativ wenig für die Messung androgenagonistischer und – antagonistischer Effekte *in vitro* (Körner et al., 2004). Hierzu gehören z.B. der rainbow trout-brain-AR-assay, ein kompetitiver Rezeptorbindungstest mit isolierten Androgenrezeptoren aus dem Gehirn von Regenbogenforellen (Leusch et al., 2006c), und der A-SCREEN-Assay, bei dem die androgenabhängige Hemmung der Zellproliferation an AR-positiven humanen Brustkrebszelllinien (MCF-7) gemessen wird (Szelei et al. 1997). Desweiteren gibt es sogenannte Reporter-Gen-Assays. Die Messung der hormonellen Aktivität erfolgt hier anhand der Expression eines farbstoffumsetzenden Enzyms und der darauffolgenden Farbveränderung. Es gibt verschiedene Testsysteme, die auf humanen oder vom Säugetier stammenden Zelllinien beruhen, wie Prostatakarzinomzellen, Brustkrebszellen oder Ovarzellen vom chinesischen Hamster, die unter der Kontrolle von humanen Androgenrezeptoren das Enzym Luciferase synthetisieren (Körner et al., 2004). Das gleiche Prinzip liegt dem Yeast-based androgen screen (YAS) zugrunde, nur dass es sich hier um Hefezellen handelt, in deren Erbgut das Gen für den humanen AR und ein Expressionsplasmid mit dem Reporter gen für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase eingefügt werden (Sohoni und Sumpter, 1998).

Bei *in-vivo*-Tests werden Veränderungen an lebenden Organismen beurteilt. Hierfür bieten sich verschiedene kleine Fische bei einer großen Bandbreite untersuchungswürdiger Parameter als kostengünstige Biomarker an (Scholz et Mayer, 2008). So stellt z.B. die Morphologie der Afterflosse von Moskitofischen einen Bioindikator für exogene androgene Einflüsse dar, da ihre geschlechtsspezifische Ausprägung durch androgene Stimulation beeinflussbar ist (Angus et al., 2001). Auch der gonadal-recrudescence-assay mit weiblichen Fettkopfbrassen zeigte sich sehr effektiv zur Feststellung von androgenen Effekten anhand verschiedener Parameter, wie die Atresie von Follikeln und die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale (Pawlowski et al., 2004a). Einen weiteren möglichen Indikator androgener Kontaminationen von Gewässern können Spigginkonzentrationen in weiblichen Stichlingen bieten (Katsiadaki et al., 2002). Spiggin ist ein Kleisterprotein, dass männliche Stichlinge für den Nestbau während der Brutzeit produzieren und dessen Synthese bei weiblichen Stichlingen mit der Behandlung von Androgenen induzierbar ist.

Als Bioassays für die Feststellung androgener oder antiandrogener Wirksamkeit von einzelnen Chemikalien eignen sich auch Versuche mit Ratten. Hier können z.B. das androgenabhängige rough-and-tumble Spielverhalten junger Ratten (Hotchkiss et al., 2002) oder Veränderungen in der Geschlechtsentwicklung weiblicher Nachkommen, die dosisabhängig durch eine Androgenbehandlung der Mutter hervorgerufen werden können, als Messparameter dienen wie z.B. eine erhöhte Anogenitaldistanz, eine

Reduktion der Saugkomplexe und die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale (Wolf et al., 2002).

#### **2.4.2 Nachweis von Androgenen**

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Steroiden im Wasser werden oft verschiedene Varianten der Chromatographie eingesetzt, die oft mit Massenspektrometrie oder Tandem-Massenspektrometrie kombiniert werden und Messungen von wenigen ng/L ermöglichen (Durhan et al., 2002; Kolodziej et al., 2003, 2004; Durhan et al., 2006). In verschmutzten Proben ist die Wiederfindungsrate aber sehr schlecht und die Methode ist teuer und aufwendig (Schmid und Frühauf, 1998).

Eine weitere äußerst sensible Methode zur Bestimmung von Hormonkonzentrationen in Wasserproben bieten Immunoassays, deren Nachweisprinzip auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht (Shore et al., 1993 a ; Schmid und Frühauf, 1998). Man unterscheidet Radio- und Enzymimmunoassays. Beim Radioimmunoassay (RIA) konkurriert das zu bestimmende Antigen mit einer definierten Menge radioaktiv markierten Antigens um die Bindung an unterdosierte Antikörper. Die Menge des verdrängten markierten Antigens ist der Menge des unmarkierten Antigens proportional. Bei dem leicht durchführbaren und preisgünstigen Enzymimmunoassay wird die Bestimmung eines Antigens oder Antikörpers durch eine farbvermittelnde Enzymreaktion nachgewiesen und so der Umgang mit radioaktiven Substanzen vermieden (Döcke, 2000).

Die Verwendung des Enzymimmunoassays bietet verschiedene Vorteile. So ist der Einsatz in einem einfach ausgestatteten Labor möglich und die Ergebnisse sind schnell verfügbar. Hormone können im aquatischen Milieu ohne weitere Vorbereitung untersucht werden (Schmid und Frühauf, 1998; Knopp et al., 1999). In den Untersuchungen von Giese (2004) und Lindemann (2005) zeigte sich der Enzymimmunoassay geeignet, um den Konzentrationsverlauf von Östron, 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron im Wasser zu verfolgen.

### **3 Material und Methode**

#### **3.1 Versuchsaufbau**

Die Versuche untergliederten sich in drei Versuchskomplexe mit folgender Fragestellung:

- der Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser (Versuchsreihen FW I-VII)
- der Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilisiertem Flusswasser, das mit einer Bakterien-Reinkultur beimpft wurde (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV)
- der Vergleich des Verlaufs der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (Versuchsreihen H I-II)

Das Versuchsprinzip bestand darin, einer Flusswasserprobe Testosteron, im dritten Versuchskomplex auch Östrogen und Progesteron, beizufügen und den Gehalt des jeweiligen Hormons über eine gewisse Zeit zu beobachten. Insgesamt wurden 21 Versuchsreihen dieses Prinzips angefertigt, welche auf unten beschriebene Weise bezüglich ihrer Versuchsansätze und Probenentnahmen variierten.

##### **3.1.1 Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser (Versuchsreihen FW I-VII)**

Insgesamt bestanden die Untersuchungen aus 7 Versuchsreihen (FW I-VII). Die Wiederholung der Versuchsreihen diente der Verifizierung der Ergebnisse. Bei den Versuchsreihen I-IV wurde der Testosterongehalt über einen Zeitraum von 28 Tagen, bei den Versuchsreihen V-VII über 6 Tage kontrolliert (Tab. 3.1).

Bei den Versuchsreihen FW I-IV bestand eine Versuchsreihe aus vier Versuchsansätzen. Der erste Versuchsansatz (1) sollte die Situation im Oberflächenwasser repräsentieren. Dazu wurden 48,5 ml Flusswasser 1,5 ml sterilfiltrierte Testosteronlösung zugefügt (Herstellung der Hormonstammlösung siehe 3.1.4.1). Die übrigen drei Ansätze waren Kontrollansätze, um die Ergebnisse aus dem ersten Ansatz interpretieren zu können. So wurde beim Ansatz 1a das verwendete Flusswasser am Tag der Entnahme aus dem Flusslauf auf einen möglichen eigenen Testosterongehalt hin geprüft. Beim zweiten Ansatz (2) wurde das Flusswasser vor Zugabe der Testosteronlösung im Autoklaven 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Beim dritten Ansatz (3) wurden 48,5 ml steriles Aqua bidest. als Medium verwendet und diesem 1,5 ml Testosteronlösung zugefügt. Der erste und zweite Ansatz wurden jeweils zweigeteilt und bei 5 °C und 20 °C 28 Tage lang in Durchstichflaschen bei Dunkelheit

aufbewahrt. Hieraus wurden an den Tagen 0, 1, 2, 3, 8, 14 und 28 Proben zur Bestimmung des Testosterongehaltes entnommen und bis zur Bestimmung bei – 20 C in Eppendorfgläsern eingefroren. Der Tag 0 war der Tag des Ansetzens, an welchem die Probe zur Bestimmung des Ausgangswertes direkt nach der Herstellung der Versuchsansätze entnommen wurde. Der dritte Ansatz lagerte 14 Tage lang bei 20 C in Durchstichflaschen und Dunkelheit und an den Tagen 0, 7 und 14 wurden Proben zur Bestimmung der Testosteronkonzentration entnommen (Tab. 3.1).

Um einen genaueren Überblick über den Testosteronabfall zu bekommen, wurden weitere drei Versuchsreihen FW V-VII angesetzt. Pro Versuchsreihe wurden die Versuchsansätze 1 und 2 wie bei den Versuchsreihen FW I-IV durchgeführt, wobei diese bei 5 C über einen Zeitraum von sechs Tagen inkubiert wurden. Die Probenentnahme erfolgte in den ersten drei Tagen morgens und nachmittags, und an den Tagen vier bis sechs einmal täglich (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1: Aufbau der Versuchsreihen FW I-VII zur Untersuchung der Testosteronkonzentration im Flusswasser; Tag 0 = Tag des Ansetzens; 1,3 bzw. 2,3 beschreiben die Probenentnahmen am Nachmittag von Tag 1 bzw. 2 (Versuchsreihen FW V-VII)**

Versuchsreihe	Versuchsansätze einer Versuchsreihe	Lagerungstemperatur	Tag der Probenentnahme
FW I-IV	1 : Flusswasser mit Testosteron	5 C und 20 C	0, 1, 2, 3, 8, 14, 28
	1a: Flusswasser	20 C	0
	2 : steriles Flusswasser mit Testosteron	5 C und 20 C	0, 1, 2, 3, 8, 14, 28
	3 : steriles Aqua bidest. mit Testosteron	20 C	0, 7, 14
FW V-VII	1 : Flusswasser mit Testosteron	5 C	0, 1, 1,3, 2, 2,3, 3, 4, 5, 6
	1a: Flusswasser	20 C	0
	2 : steriles Flusswasser mit Testosteron	5 C	0, 1, 1,3, 2, 2,3, 3, 4, 5, 6

Das verwendete Flusswasser wurde mit einer braunen Glasflasche der Spree im Berliner Stadtverlauf aus etwa 1 m Tiefe entnommen. Am Tag der Entnahme erfolgte die Bestimmung von Wassertemperatur, pH-Wert und Gesamtkeimzahl. Für die Versuchsreihen FW I und II wurde zu verschiedenen Zeiten Wasser entnommen, die

Versuchsreihen FW III und IV wurden aus einer Wasserprobe erstellt. Die Durchführung dieser Versuchsreihen erfolgte im Frühjahr (siehe Anhang, Tab. 9.1).

Die Durchführung der Versuchsreihen FW V-VII erfolgte im Spätsommer. Die Versuchsreihen FW V und VI wurden aus einer Wasserprobe erstellt (siehe Anhang, Tab. 9.1).

### **3.1.2 Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilisiertem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV)**

Es konnten drei Bakterien aus dem Flusswasser identifiziert werden (Identifizierung siehe 3.1.4.3): *Aeromonas sobria* (AS), *Alcaligenes faecalis* (AF) und *Citrobacter freundii* (CF). Um zu sehen, ob eine dieser Spezies eine direkte Wirkung auf das Testosteron hat, sind pro Spezies vier, also insgesamt 12 Versuchsreihen durchgeführt worden. Eine Versuchsreihe bestand aus zwei Versuchsansätzen:

Beim Versuchsansatz 1 wurden 48 ml sterilisiertem Flusswasser 1,5 ml sterilfiltrierte Testosteronlösung (Herstellung der Hormonstammlösung siehe 4.1.4.1) und 0,5 ml Keimsuspension (Herstellung einer Bakterien-Reinkultur siehe 3.1.4.3) zugefügt. Der zweite Ansatz bestand aus 48,5 ml sterilem Flusswasser und 1,5 ml sterilfiltrierter Testosteronlösung. Die Ansätze wurden in Durchstichflaschen und Dunkelheit über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 20 °C aufbewahrt. An den Tagen 0, 1, 2, 5, 7, 15 und 28 und bei den Versuchsreihen III und IV zusätzlich an den Tagen 6 und 8 wurden Proben zur Bestimmung des Testosterongehaltes entnommen und bis zur Bestimmung bei – 20 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren (Tab. 3.2). Der Tag 0 war der Tag des Ansetzens, an welchem die Probe zur Bestimmung des Ausgangswertes direkt nach der Herstellung der Versuchsansätze entnommen wurde.

Zur Durchführung dieser Versuchsreihen wurde dreimal Wasser aus der Spree entnommen und anschließend im Autoklaven 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Mit der ersten Wasserprobe wurden die Versuchsreihen AS/AF/CF I und II, mit der zweiten Wasserprobe die Versuchsreihen AF III, CF III und IV und mit der dritten Wasserprobe die Versuchsreihen AF IV, AS III und IV angesetzt (siehe Anhang, Tab. 9.19).

### **3.1.3 Vergleich des Verlaufs der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (Versuchsreihen H I-II)**

In diesem Versuch sollten die Konzentrationsverläufe von Testosteron, Östron und Progesteron in Abhängigkeit von der Zeit direkt miteinander verglichen werden können. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Hierzu wurden 45,5 ml Flusswasser je 1,5 ml



sterilfiltrierte Testosteron-, Progesteron- und Östronstammlösung zugefügt, so dass wieder eine Gesamtmenge von 50 ml entstand (Herstellung der Hormonstammlösung siehe 3.1.4.1). Bei 5 C und Dunkelheit erfolgte in Durchstichflaschen eine Lagerung über 28 Tage, während der an den ersten drei Tagen morgens und nachmittags, an den Tagen 4-14 einmal täglich und abschließend am 28.Tag eine Probe entnommen wurde (Tab. 3.3). Bis zur Bestimmung wurden die Proben bei – 20 C in Eppendorfgefäßen eingefroren. Am Tag des Ansetzens wurde die Probe zur Bestimmung des Ausgangswertes direkt nach der Herstellung des Ansatzes entnommen. Das verwendete Flusswasser wurde im Januar mit einer braunen Glasflasche der Spree im Berliner Stadtverlauf aus etwa 1 m Tiefe entnommen. Am Tag der Entnahme erfolgte die Bestimmung von Wassertemperatur, pH-Wert und Gesamtkeimzahl.

**Tabelle 3.2: Aufbau der Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV zur Untersuchung des Verlaufs der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser, das mit einer Bakterien-Reinkultur beimpft wurde; Tag 0 = Ausgangswert**

Versuchsreihe	Versuchsansätze einer Versuchsreihe	Lagerungstemperatur	Tag der Probenentnahme
<b>AS/AF/CF I, II</b>	1 : steriles Flusswasser mit Testosteron und Keimsuspension	20 C	0, 1, 2, 5, 7, 15, 28
	2 : steriles Flusswasser mit Testosteron		0, 1, 2, 5, 7, 15, 28
<b>AS/AF/CF III, IV</b>	1 : steriles Flusswasser mit Testosteron und Keimsuspension	20 C	0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 15, 28
	2 : steriles Flusswasser mit Testosteron		0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 15, 28

AS = *Aeromonas sobria*

AF = *Alcaligenes faecalis*

CF = *Citrobacter freundii*

**Tabelle 3.3: Aufbau der Versuchsreihen H I-II zur Untersuchung der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser; Tag 0 = Tag des Ansetzens; 1,3, 2,3 bzw. 3,3 beschreiben die Probenentnahmen am Nachmittag von Tag 1, 2 bzw. 3**

Versuchsreihe	Versuchsansätze einer Versuchsreihe	Lagerungstemperatur	Tag der Probenentnahme
<b>H I, II</b>	Flusswasser mit Testosteron, Progesteron und Östron	5 C	0, 1, 1,3, 2, 2,3, 3, 3,3, 4-14, 28

### **3.1.4 Herstellung der Lösungen für die Versuchsansätze**

#### **3.1.4.1 Herstellung der Hormonstammlösungen**

Für die Versuche wurden folgende Hormone in lyophilisierter Form bezogen:

- Testosteron → Firma Riedel-de-Haen, Bestellnr. 46923
- Östron → 1,3,5,(10)-estratriene-3-ol-17-one, Firma Sigma, Bestellnr. E-1132
- Progesteron → 4-Pregnen-3,20-dion (P4), Firma Sigma, Bestellnr. P-9776

Vor der jeweiligen Verwendung mussten die Hormone in Lösung gebracht werden. Dazu wurde 1 mg lyophilisiertem Hormon 1 ml Methanol zugefügt, dies mit Parafilm abgedeckt und 24 Stunden stehen gelassen. Dem Progesteron musste vor der Zugabe des Methanols zunächst Wasser entzogen werden. Ein Exsikkatortopf wurde dazu mit Kieselgel befüllt, das lyophilisierte Progesteron in einer Petrischale in den Topf gestellt und dieser verschlossen für vier Stunden bei 37 °C in den Brutschrank verbracht.

Das in Methanol gelöste Hormon wurde anschließend mit Assaypuffer (s. 3.1.4.2) verdünnt, so dass in 10 ml Hormon-Assaypuffer-Lösung 5000 ng bzw. in 1,5 ml Lösung 750 ng Hormon, enthalten waren. Eine Versuchsansatzlösung von 50 ml, in der 1,5 ml dieser Hormon-Assaypuffer-Lösung enthalten waren, wies also rechnerisch einen Gesamt-Hormongehalt von 750 ng auf. Dies entspricht einer Hormonkonzentration von 150 pg in 10 µl Versuchsansatzlösung (10 µl Versuchsansatzlösung wurden zur Bestimmung des Hormongehaltes verwendet). Die Hormon-Assaypuffer-Lösung wurde vor der Zugabe in die Versuchsansatzlösung mit einem Spritzenfilter (Porengröße 1,2 µm) sterilfiltriert.

#### **3.1.4.2 Herstellung des Assaypuffers**

Der Assaypuffer setzte sich zusammen aus 2,42 g Trishydroxymethylaminomethan, 17,9 g Natrium-Chlorid, 1,0 g Rinder-Serum-Albumin und 1,0 ml Tween 80 (alle von der Firma Merck). Diese Substanzen wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und mit 1M Salzsäure (920 ml Aqua bidest. mit 80 ml HCL) ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit einem Spritzenfilter (Porengröße 1,2 µm).

### 3.1.4.3 Isolierung von Bakterien und Herstellung von Bakterien-Reinkulturen

In Zusammenhang mit der jeweils ersten Gesamtkeimzahlbestimmung im Flusswasser (s. 3.1.5) wurde zusätzlich eine Isolierung der einzelnen Kolonien vorgenommen, um sie weiter zu differenzieren und möglichst zu identifizieren.

Hierzu wurde Material einer Kolonie mit einer abgeflammtten Öse aufgenommen, auf einem Standard-Nährboden (Standard I - Nähragar der Firma Merck) ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf den Gehalt von Katalase und Oxidase und ihr Verhalten bei einer Gram-Färbung geprüft.

Anhand dieser Vordifferenzierung wurden sie mit Hilfe der Identifizierungssysteme api® 20 E und 20 NE der Firma bioMérieux, Frankreich, weiterdifferenziert. Dies sind Testkits zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen, nicht anspruchsvollen Stäbchen. Die identifizierten Bakterien wurden bis zur Weiterverwendung in Kryoröhrchen der Firma Mast Diagnostica (Cryobank; das Stammhaltungssystem für Mikroorganismen) eingefroren.

Zur Herstellung der Bakterien-Reinkultur wurden die eingefrorenen Bakterien wieder aufgetaut, auf Standard-Nährböden (Standard I - Nähragar der Firma Merck) ausgestrichen und 24 Stunden im Brutschrank bei 37 C aufbewahrt. Die gewachsenen Kolonien wurden nun mit 0,9%iger Natriumchloridlösung abgeschwemmt und mit Hilfe eines Photometers (SPECORD 200, Analytic Jena) eine Verdünnung hergestellt, in der in 1 ml Bakteriensuspension  $10^8$  koloniebildende Einheiten enthalten sind.

Es konnten drei Bakterien aus dem Flusswasser identifiziert und isoliert werden: *Aeromonas sobria*, *Alcaligenes faecalis* und *Citrobacter freundii*.

### 3.1.5 Kontrolle der Versuchsansätze durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Vor der Verwendung des Flusswassers wurde dessen Gesamtkeimzahl bestimmt. Dies wurde bei den unsterilen Versuchsansätzen in der Mitte und am Ende der Untersuchungszeit wiederholt. Die Sterilität der sterilen Ansätze wurde ebenfalls in der Mitte und am Ende des Versuchszeitraumes überprüft.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt: 1 ml der Ausgangsflüssigkeit in 9 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung (Verdünnung von 1:10); 1 ml der 1:10-Verdünnung wiederum in 9 ml 0,9%ige NaCl-Lösung (Verdünnung von 1:100) usw. Nun wurden pro Verdünnungsschritt zweimal 0,1 ml Lösung auf je einen Nährboden (Standard I - Nähragar für anspruchsvolle Bakterien der Firma Merck)

verbracht, mit sterilem Spatel ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C im Brutschank inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Kolonien beider Nährböden einer Verdünnungsstufe ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Betrag multipliziert mit dem Grad der Verdünnung ergibt die Menge der koloniebildenden Einheiten (KbE) in der Ausgangslösung.

Für die Sterilitätskontrollen der sterilen Ansätze wurden zweimal 0,1 ml unverdünnte Ansatzlösung pro Versuchsansatz auf je einen Nährboden (Standard I - Nähragar für anspruchsvolle Bakterien der Firma Merck) verbracht, mit sterilem Spatel ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C im Brutschank inkubiert.

### 3.2 Hormonbestimmung mittels Enzymimmunoassay

Der Hormongehalt der Proben wurde mit einem kompetitiven Enzymimmunoassay (EIA / ELISA) bestimmt. Beim Enzymimmunoassay wird die Anwesenheit eines Antigens oder Antikörpers durch eine Enzymreaktion, die eine Farbveränderung bewirkt, sichtbar. Man unterscheidet kompetitive EIA und nichtkompetitive EIA. Beim kompetitiven EIA ist an eine Festphase ein Antikörper fixiert. Dieser Antikörper kann das gesuchte, aber auch ein Enzym-markiertes Antigen binden. Es konkurrieren also gesuchtes Antigen und Enzym-markiertes Antigen um die Bindung am Antikörper auf der Festphase. Durch die Zugabe eines Substrates, das mit dem Enzym des am AK haftenden markierten Antigens reagiert und so eine Farbänderung verursacht, kann nun der Gehalt des gesuchten Antigens bestimmt werden. Die Farbintensität ist dann umgekehrt proportional zum Gehalt des gesuchten Antigens.

Zur Durchführung des Enzymimmunoassays wurde ein Testkit des Institutes für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien verwendet. Dies bestand aus folgenden Komponenten:

- Coating-AK: ein Schaf-Anti-Kaninchen-Antikörper, der beim Schaf erzeugt wurde und gegen das IgG des Kaninchens gerichtet ist
- AK: spezifischer Antikörper vom Kaninchen (IgG), der gegen Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol bzw. Progesteron gerichtet ist
- Enzymlabel (EL): mit Biotin markiertes Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol bzw. Progesteron
- Testosteron, Östron bzw. Progesteron als Standardsubstanz

Nach Angaben des Herstellers bestehen Kreuzreaktionen der Antikörper gegen

- Testosteron zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (23,7 %), 5 $\beta$ -Dihydrotestosteron (12,3 %), 4-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (7,6 %) und 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (5,5 %)

- 17 $\beta$ -Östradiol zu Östron (100 %), 17 $\alpha$ -Östradiol (145 %) und Östriol (14 %)
- Progesteron besonders zu 4-Pregnen-2 $\alpha$ -ol-3,20-dion (182 %), 5 $\alpha$ -Pregnan-3,20-dion (168 %), 5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one (89 %) und 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one (88 %)

### 3.2.1 Vorbereitung der Mikrotiterplatte

Als feste Phase dienten F 96 Maxisorb Mikrotiterplatten aus Polypropylen der Firma Nunc (Dänemark), die zunächst mit dem Coating-AK (s. 3.2.6) beschichtet werden mussten. Dazu wurden in jede Vertiefung 250  $\mu$ l des in Coating-Puffer (s. 3.2.6) gelösten Coating-Antikörpers verbracht, die Mikrotiterplatten mit Parafilm und einem Deckel verschlossen und bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. In dieser Zeit konnten die Schaf-Anti-Kaninchen-Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiterkammern binden. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Platten abgekippt und mit 300  $\mu$ l Gegencoating-Puffer (s. 3.2.6) pro Mikrotiterplattenvertiefung versehen. In der folgenden dreistündigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden die freien Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte nun durch das im Gegencoating-Puffer enthaltene Rinderserumalbumin blockiert. Die so behandelten Mikrotiterplatten waren bei einer Lagerung bei – 20 °C ein halbes Jahr und bei der Lagerung bei 4 °C vier Wochen haltbar.

Für die Durchführung des Enzymimmunoassays mussten die Mikrotiterplatten zunächst wieder langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und anschließend viermal mit Tween 20 Waschlösung (s. 3.2.6) gewaschen und kräftig ausgeklopft werden, so dass die Kammern frei von Rückständen waren.

### 3.2.2 Bestückung der Mikrotiterplatte

Bei jeder Platte wurden die unspezifische (BU) und die maximale Bindung (BO) des Biotin-markierten Hormons gemessen (Tab. 3.4). Dazu wurden für die unspezifische Bindung 150  $\mu$ l und für die maximale Bindung 50  $\mu$ l Assay-Puffer (s. 3.1.4.2) in je drei Mikrotiterplattenvertiefungen pipettiert und bei der unspezifischen Bindung mit 100  $\mu$ l Enzymlabel (s. 3.2.6), bei der maximalen Bindung mit 100  $\mu$ l Enzymlabel und 100  $\mu$ l spezifischem Antikörper (s. 3.2.6) aufgefüllt (Tab. 3.4). Während die unspezifische Bindung widerspiegelt, wieviel Biotin-markiertes Hormon auch in Abwesenheit von hormonspezifischem Antikörper an den Coating-AK bindet, zeigt die maximale Bindung die größtmögliche Menge an Biotin-markiertem Hormon, die der spezifische Antikörper binden kann.

Nachfolgend wurden nun die Standardpunkte 1-9 (Herstellung einer Standardkurve s. 3.2.6) und die Proben der Versuchsansätze auf die Mikrotiterplatte verbracht (10 µl pro Kammer). Diese wurden mit jeweils 40 µl Assay-Puffer aufgefüllt und anschließend spezifischer Antikörper und Enzymlabel in alle Kammern pipettiert (jeweils 100 µl) (Tab. 3.4). Nach vollständiger Verbringung der Reagenzien wurde die Platte mit Parafilm und Deckel luftdicht verschlossen und über Nacht bei 5 °C und 350-450 U/min inkubiert. In diesem Schritt bindet der spezifische Antikörper, der ein Antikörper vom Kaninchen (IgG) und gegen das jeweils zu bestimmende Hormon gerichtet ist, an dem auf der Mikrotiterplatte fest fixierten Schaf-Anti-Kaninchen-Antikörper. Das in den Proben befindliche freie Hormon und das im Enzymlabel mit Biotin markierte Hormon konkurrierten nun um die Bindungsstellen des Kaninchen-Antikörpers.

Nach ca. 24 Stunden wurden ungebundene Bestandteile durch viermaliges Waschen mit Tween 20 Waschlösung entfernt. Am Coating-Antikörper hafteten nun AK mit freiem Hormon und AK mit Biotin-markiertem Hormon.

**Tabelle 3.4: Übersicht der Bestückung einer Mikrotiterplatte**

	Assaypuffer	Standard / Probe	Antikörper	Enzymlabel	Gesamtmenge pro Kammer
BU	150 µl	-	-	100 µl	250 µl
BO	50 µl	-	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 1	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 2	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 3	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 4	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 5	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 6	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 7	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 8	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Standardpunkt 9	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Probe 1	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
Probe 2	40 µl	10 µl	100 µl	100 µl	250 µl
usw.	usw.	usw.	usw.	usw.	usw.

BU: unspezifische Bindung

BO: maximale Bindung

Standardpunkt: Probe zur Erstellung der Standardkurve

### 3.2.3 Belegung der Mikrotiterplatten

Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Da durch unspezifische Bindung, maximale Bindung und die Standardpunkte 1-9 insgesamt 33 Kammern belegt wurden, blieben 63 Kammern für 21 Proben frei. Dies bot die Möglichkeit, alle Proben einer

Verlaufskurve auf einer Platte zu platzieren und pro Platte bis zu drei verschiedene Verlaufsuntersuchungen zu messen.

Für die Untersuchungen zum Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 28 Tage (FW I-IV) wurden so pro Versuchsreihe zwei Platten verwendet (Tabelle 3.5). Bei den Untersuchungen zum Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 6 Tage (FW V-VII) wurden beide Ansätze einer Versuchsreihe auf eine Mikrotiterplatte verbracht (Tabelle 3.5). Die Verteilung der Versuchsansätze zum Einfluss einer Bakterien-Suspension auf den Verlauf der Testosteronkonzentration der Versuchsreihen AS/AF/CF I und II und der Versuchsreihen AS/AF/CF III und IV erfolgte unterschiedlich (Tabelle 3.5). Bei den Versuchen zum Vergleich der Konzentrationsverläufe von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (H I-II) wurde pro Platte eine Verlaufsuntersuchung vorgenommen. Es wurden insgesamt sechs Platten verwendet (Tabelle 3.5).

### **3.2.4 Färbung**

In jede Kammer wurden nun 250 µl eines Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugates (s. 3.2.6) pipettiert und die Platte, mit Parafilm und Deckel luftdicht verschlossen, im Kühlschrank bei 350-450 U / min inkubiert. Streptavidin-POD verbindet sich mit dem Biotin des Enzymlabels. Nach 45 Minuten wurden nichtgebundene Bestandteile gründlich durch viermaliges Waschen mit Tween 20 entfernt, wobei die Platte bei jedem Waschgang eine Minute geschüttelt wurde.

Nun wurden pro Kammer der Mikrotiterplatte 250 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung (s. 3.2.6) hinzugegeben und die Platte noch mal mit Parafilm und Deckel luftdicht verschlossen und für 45 Minuten im Kühlschrank bei 350-450 U/min belassen. Das Tetramethylbenzidin wird durch die Peroxidase hydrolysiert, woraufhin sich die Lösung blau färbt. Nach 45 Minuten wurden pro Kammer 50 µl 2-molare Schwefelsäure zugegeben, wodurch die Enzym-Reaktion gestoppt wurde und die Farbe der Lösung von blau nach gelb wechselte.

### **3.2.5 Messung der Extinktion**

Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Reader SLT Spectra der Firma Tecan. Die optische Dichte entsprach dabei der Menge des gebundenen Biotin-markierten Hormons.

**Tabelle 3.5: Belegung der Mikrotiterplatten mit den Versuchsansätzen der verschiedenen Versuchsreihen**

Platte	Versuchsreihe	Versuchsansatz
1	FW I	1: 5 C, 20 C, 2: 5 C
2		1: 20 C, 1a, 2: 20 C, 3
3	FW II	1: 5 C, 20 C, 2: 5 C
4		1: 20 C, 1a, 2: 20 C, 3
5	FW III	1: 5 C, 20 C, 2: 5 C
6		1: 20 C, 1a, 2: 20 C, 3
7	FW IV	1: 5 C, 20 C, 2: 5 C
8		1: 20 C, 1a, 2: 20 C, 3
9	FW V	1: 5 C, 1a, 2: 5 C
10	FW VI	
11	FW VII	
12	AF I / AS I / CF I	1
13	AF II / AS II / CF II	
14	AS I und II	2
15	CF I und II	
16	AF I und II	
17	AS III	1, 2
18	AS IV	
19	AF III	
20	AF IV	
21	CF III	
22	CF IV	
23	H I	Testosteron
24	H I	Östron
25	H I	Progesteron
26	H II	Testosteron
27	H II	Östron
28	H II	Progesteron

FW I-VII,                    1: Flusswasser mit Testosteron, 5 C / 20 C; 1a: Flusswasser, 20 C  
                                   2: steriles Flusswasser mit Testosteron, 5 C / 20 C  
                                   3: steriles Aqua bidest. mit Testosteron 20 C

AS/AF/CF I-IV,            1: Testosteron in sterilem Flusswasser mit Bakterien-Suspension, 20 C  
                                   2: Testosteron in sterilem Flusswasser, 20 C

H I-II,                        Flusswasser mit Testosteron / Östron / Progesteron, 5 C

### 3.2.6 Herstellung der Lösungen und Reagenzien für den Enzymimmunoassay

#### Coating-AK

Der Coating-AK lag lyophilisiert vor und musste zunächst mit 500 µl Coating-Puffer in Lösung gebracht werden. Dazu wurden Coating-AK und Coating-Puffer gut vermischt und



für mindestens 20 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 250 ml Coating-Puffer zugefügt.

#### Coating-Puffer

1,59 g Natriumcarbonat und 2,93 g Natriumhydrogencarbonat wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert von 9,6 wurde mit 1-molarer Salzsäure eingestellt. Der Coating-Puffer war im Kühlschrank 14 Tage haltbar.

#### Gegencoating-Puffer

3,146 g Trishydroxyaminomethan, 23,3 g Natriumchlorid, 13,0 g Rinder-Serum-Albumin (Firma Sigma, A4503) und 1,3 g Natriumazid wurden in 1300 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert von 7,5 wurde mit 1-molarer Salzsäure eingestellt und anschließend mit einem Spritzenfilter gereinigt. Der Gegencoating-Puffer war im Kühlschrank vier Wochen haltbar.

#### Enzymlabel

Die mit Biotin markierten Hormone Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol bzw. Progesteron lagen lyophilisiert vor. Sie wurden zunächst mindestens 20 Minuten in Methanol gelöst und anschließend mit Assaypuffer vermengt, so dass folgende Arbeitsverdünnungen entstanden:

Testosteron → 1 : 5 000 000

Progesteron → 1 : 600 000

Östrogen → 1 : 4 000 000

#### Antikörper

Die Antikörper gegen Testosteron, 17 $\beta$ -Östradiol bzw. Progesteron lagen lyophilisiert vor. Sie wurden 20 Minuten in Aqua bidest. gelöst und anschließend mit Assaypuffer vermengt, so dass folgende Arbeitsverdünnungen entstanden:

Testosteron → 1 : 75 000

Progesteron → 1 : 15 000

Östrogen → 1 : 80 000

#### Herstellung einer Standardkurve

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe eines Hormon-Standards hergestellt. Der Standard (Testosteron, Östron bzw. Progesteron als Standardsubstanz) wurde dafür in Assaypuffer (Herstellung des Assaypuffers s. 3.1.4.2) gelöst, so dass eine Arbeitsverdünnung von 1250 pg/10  $\mu$ l entstand. Aus dieser Lösung wurden 100  $\mu$ l

entnommen, mit 150 µl Assaypuffer vermengt und auf dem Rüttler gut durchmischt. So entstand eine Lösung mit einem Hormongehalt von 500 pg/10 µl. Anschließend wurden aus dieser Verdünnung wiederum 100 µl mit 150 µl Assaypuffer vermengt. Dieser Verdünnungsschritt von 1:2,5 wurde insgesamt neunmal wiederholt, so dass neun Verdünnungen, Standardpunkte 1-9, mit folgenden Konzentrationen entstanden: 0,33 pg/10 µl (Standardpunkt 1); 0,82 pg/10 µl; 2,05 pg/10 µl; 5,12 pg/10 µl; 12,8 pg/10 µl; 32 pg/10 µl; 80 pg/10 µl; 200 pg/10 µl; 500 pg/10 µl (Standardpunkt 9)

#### Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat

1 µl Streptavidin-POD-Konjugat (Roche) wurde mit 30 ml Assaypuffer vermengt, so dass eine Arbeitsverdünnung von 1: 30 000 vorlag.

#### Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung

TMB/Substrate Solution (Seramun), gebrauchsfertig.

#### Tween 20 Waschlösung

1 ml Tween 20 (Merck) wurden mit 2000 ml Aqua bidest. verdünnt.

### **3.3 Berechnung der Hormonkonzentration**

Die Errechnung der Hormonkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Programms Statistica Version 6 auf Basis der optischen Dichte (OD) der Versuchsprouben. Voraussetzung dafür war die definierte Zuordnung der gemessenen OD-Werte zu entsprechenden Konzentrationen. Auf jede Mikrotiterplatte wurden aus diesem Grund die Standardpunkte 1-9 aufgebracht. Jeder Standardpunkt entsprach einer bekannten Konzentrationsstufe (Herstellung einer Standardkurve s. 3.2.6). Die aus den OD-Werten der Standardpunkte berechnete Standardkurve lieferte die Kalibration für die jeweilige Platte. Zur Berechnung der Standardkurve wurde folgende logistische Funktion verwendet, welche die Abhängigkeit der OD-Werte von den jeweiligen Konzentrationsstufen  $S_i$  beschreibt:

$$OD(S_i) = a / (1 + e^{b+c \cdot S_i})$$

$S_i$  = bekannte Konzentrationsstufe ( $i = 1, 2, \dots, 9$ )  
 $OD(S_i)$  = optische Dichte der Konzentrationsstufe  $S_i$   
 $a, b, c$  = Koeffizienten der logistischen Funktion

Das Statistica-Programm passte nun durch Schätzung der Koeffizienten  $a, b$  und  $c$  eine Kurve bestmöglich an die Standardpunkte an (Abb. 3.1). Nun war es möglich, einem

beliebigen OD-Wert (OD) einen entsprechenden Punkt ( $\hat{S}$ ) auf der Standardkurve zuzuweisen, indem die Funktion folgendermaßen umgestellt wurde:

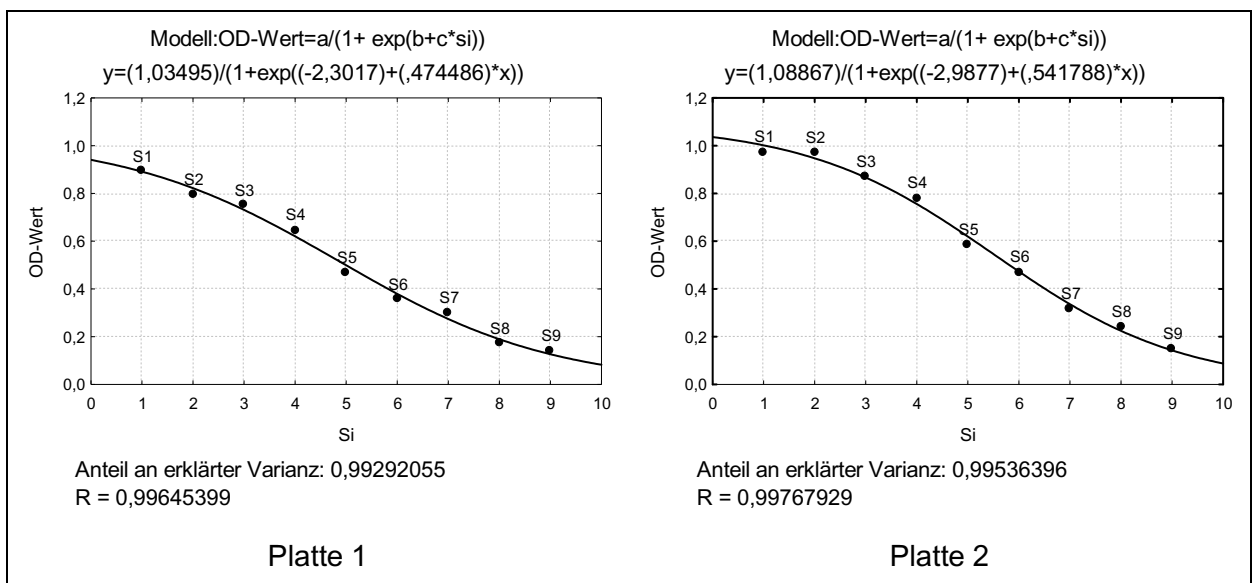
$$\hat{S}(\text{OD}) = (\ln(\alpha / \text{OD} - 1) - \beta) / \gamma$$

$\hat{S}(\text{OD})$  = geschätzte Konzentrationsstufe für OD  
 OD = beliebiger OD-Wert  
 $\alpha, \beta, \gamma$  = geschätzte Koeffizienten

Zur Berechnung der Konzentrationen wurden die ermittelten OD-Werte der Proben in die Formel eingesetzt, um so die entsprechenden Konzentrationsstufen  $\hat{S}$  zu erhalten. Durch nachstehende Formel konnten anschließend aus den Konzentrationsstufen die Konzentrationen ermittelt werden:

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

K = Konzentration  
 $\hat{S}$  = geschätzte Konzentrationsstufe



**Abb. 3.1 Standardkurven der Mikrotiterplatten 1 und 2 (Versuchsreihe FW I)**

Die Konzentration wurde in pg/10  $\mu$ l gemessen. Der für die Testosteronbestimmung errechnete Variationskoeffizient betrug für den Interassay 20,64 % (n = 21) und für den Intraassay 22,68 % (n = 12). Es wurden minimale Konzentrationen bis zu 0,01 pg festgestellt.

### 3.4 Statistische Auswertung der Zeitverläufe

Alle auf die Platte verbrachten Proben (BU, BO, Standardpunkte, Versuchsproben) wurden dreimal bestimmt. Für die Auswertung wurde der Median herangezogen, um den Einfluss einzelner extremer Messwerte zu begrenzen. Die statistische Bearbeitung erfolgte mit den Programmen Statistica Version 6.0 und SPSS Version 11.0.

Mit Hilfe von Statistica wurde den Ergebnissen eines Versuchsansatzes die logistische Funktion  $Konz = a / (1 + \exp(b + c \cdot \text{zeit}))$  angepasst.

Die Ergebnisse der Versuchsansätze

- Testosteron in Flusswasser über 28 Tage bei 5 °C und 20 °C (Versuchsreihen FW I-IV)
- Testosteron in Flusswasser über 6 Tage bei 5 °C (Versuchsreihen FW V-VII)
- Testosteron, Östron und Progesteron in Flusswasser bei 5 °C (Versuchsreihen H I-II)

ließen eine gute Anpassung der Funktion zu. Bei der Anpassung konnten dabei die Koeffizienten a, b und c der logistischen Funktion je nach Voreingabe der Startwerte variieren. Die Kurven blieben dabei aber stabil.

Die Konzentrationsverläufe der übrigen Versuchsansätze

- Testosteron in sterilem Flusswasser über 28 Tage bei 5 °C bzw. 20 °C (FW I-IV, AS/AF/CF I-IV)
- Testosteron in sterilem Aqua bidest. über 14 Tage bei 20 °C (FW I-IV)
- Testosteron in sterilem Flusswasser über 6 Tage bei 5 °C (FW V-VII)
- Testosteron in sterilem Flusswasser mit Keimsuspension über 28 Tage bei 20 °C (AS/AF/CF I-IV)

entsprachen hingegen nicht dem sigmoiden Modell, weshalb auf eine Anpassung durch die logistische Funktion verzichtet wurde. Daher wurden die Ergebnisse zusätzlich mittels Boxplots und Prozentualverläufen mit dem Programm SPSS bearbeitet und dargestellt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser (Versuchsreihen FW I-VII)**

#### **4.1.1 Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 28 Tage (Versuchsreihen FW I-IV)**

Es wurden vier Versuchsreihen (FW I-IV) durchgeführt. Die Versuchsreihe FW I wurde im März, die Versuchsreihen FW II, III und IV im April angesetzt (Anhang Tabelle 9.1). Eine Versuchsreihe bestand aus vier Versuchsansätzen:

Ansatz 1: Flusswasser mit Testosteron

Ansatz 1a: Flusswasser

Ansatz 2: sterilisiertes Flusswasser mit Testosteron

Ansatz 3: Aqua bidest. mit Testosteron

Ansatz 1 und 2 wurden zweigeteilt, der eine Teil bei 5 °C und der andere Teil bei 20 °C aufbewahrt. Es wurde erwartet, dass das zugefügte Testosteron im nicht sterilisierten Flusswasser durch Mikroorganismen abgebaut wird. Folglich sollte im sterilen Flusswasser die Testosteronkonzentration nicht abfallen. Aus beiden Ansätzen wurden an den Tagen 0, 1, 2, 3, 8, 14 und 28 Proben zur Bestimmung des Testosterongehaltes entnommen.

Im Ansatz 1a wurde das verwendete Flusswasser am Tag der Entnahme auf einen eigenen Testosterongehalt hin getestet. Die ermittelten Werte schwankten zwischen 0 und 2,43 pg/10 µl, wobei letzterer Wert als einziger über 1 pg/10 µl lag.

Ansatz 3 diente als Kontrollansatz, ob abiotische Faktoren im sterilisierten Flusswasser möglicherweise einen Einfluss auf das zugefügte Testosteron haben. Er wurde bei 20 °C aufbewahrt und an den Tagen 0, 7 und 14 wurden Proben zur Bestimmung des Testosterongehaltes entnommen.

##### **4.1.1.1 Verlauf der Testosteronkonzentration in nicht sterilisiertem Flusswasser**

Es werden die Ergebnisse der Versuchsansätze Testosteron im Flusswasser bei 5 °C und Testosteron im Flusswasser bei 20 °C der Versuchsreihen FW I-IV miteinander verglichen. Alle Proben der Versuchsansätze einer Versuchsreihe waren zur Bestimmung der Testosteronkonzentration auf derselben Mikrotiterplatte platziert, wo sie einer Dreifachbestimmung unterzogen wurden. Zur Betrachtung der Ergebnisse wurde der hieraus ermittelte Medianwert herangezogen. Die Berechnung der Verlaufskurven erfolgte

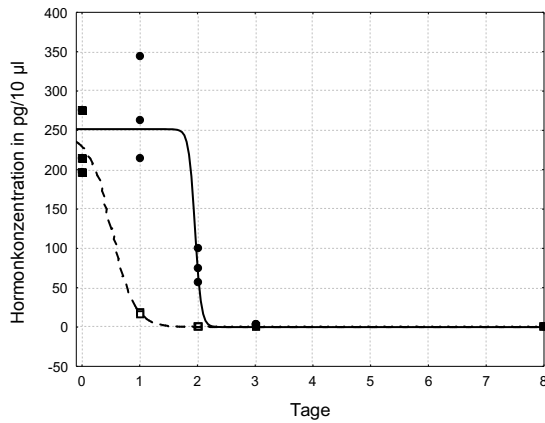
zusätzlich mit Hilfe der Einzelwerte. Da sie dabei stabil blieben, werden hier die Verlaufskurven aus den Einzelwerten aufgeführt, um die Varianz der Werte darstellen zu können (siehe Abb. 4.1). Weiter wird bei den Abbildungen auf die grafische Darstellung des 14. und des 28. Tages verzichtet, da der Testosterongehalt aller Versuchsansätze ab dem 8. Tag nicht mehr bzw. nur noch in geringsten Mengen nachzuweisen war.

Die Ausgangs-Testosteronkonzentration der Versuchsreihe FW I betrug 214,9 pg/10 µl. Bei beiden Lagerungstemperaturen wurden innerhalb von drei Tagen über 95 % des zugegebenen Testosterons abgebaut. Beim 20 °C - Ansatz wurde bereits ab dem zweiten Tag kein Testosteron mehr nachgewiesen. Bei 5 °C wurde am Tag 2 noch eine Testosteronkonzentration von 75,1 pg/10 µl gemessen, die bis zur Probenentnahme am Tag 3 auf 2,5 pg/10 µl abgefallen war. Am Tag 8 wurden noch 1,1 pg Testosteron/10 µl gemessen, wohingegen in den Proben des 14. und des 28. Tages kein Testosteron mehr nachzuweisen war (siehe Abb. 4.1; Anhang Tabelle 9.3).

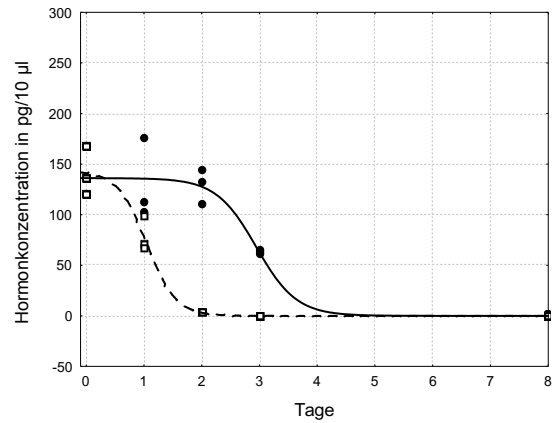
In der Versuchsreihe FW II reduzierte sich die Testosteronkonzentration innerhalb von 2 bis 8 Tagen auf weniger als 5 % vom Ausgangswert (135,3 pg/10 µl). Im Fall der Aufbewahrung bei 20 °C war die Testosteronkonzentration am Tag 2 auf 3 pg/10 µl abgesunken und fiel dann weiter auf 0,1 pg/10 µl am 3. Tag. Bei der 5 °C-Lagerung lag die Testosteronkonzentration am Tag 3 mit gemessenen 61,9 pg/10 µl deutlich höher. Am 8. Tag wurde hier ein Wert von 0,8 pg/10 µl festgestellt, wobei die Verlaufskurve ein vergleichbares Minimum am Tag 4 aufzeigt (siehe Abb. 4.1). An den folgenden Entnahmetagen (20 °C: 8, 14, 28; 5 °C: 14, 28) wurde kein Testosteron mehr nachgewiesen (Anhang Tabelle 9.5).

Beim 20 °C - Ansatz der Versuchsreihe FW III sank die Testosteronkonzentration bereits am Tag 1 von einem Ausgangswert von 130,6 pg/10 µl auf 2,5 pg/10 µl, wohingegen bei der 5 °C-Lagerung erst am dritten Tag geringste Konzentrationen (0,2 pg/10 µl) erreicht wurden. An den folgenden Entnahmetagen wurden Konzentrationen um die 0,2 pg (20 °C) und 0,1 pg (5 °C)/10 µl gemessen (siehe Abb. 4.1; Anhang Tabelle 9.7).

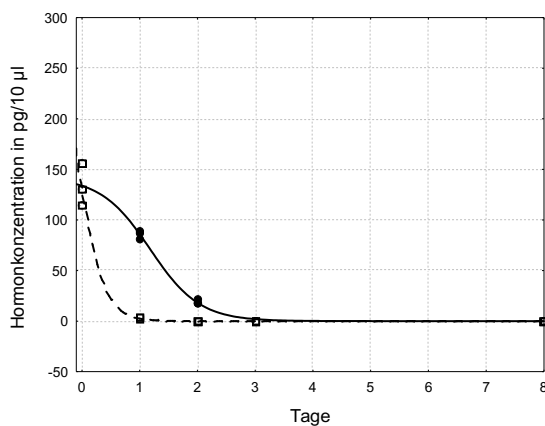
In der Versuchsreihe FW IV fiel die Testosteronkonzentration ausgehend von einem Anfangswert von 123,5 pg/10 µl bei der 20 °C-Lagerung bis zum 2. Tag auf 0,3 pg/10 µl. Bei der 5 °C-Lagerung wurden an diesem Tag noch 30,8 pg/10 µl, am 3. Tag 0,8 pg/10 µl und an den folgenden Entnahmetagen 0,4 pg bis 0,7 pg/10 µl gemessen (siehe Abb. 4.1; Anhang Tabelle 9.9).



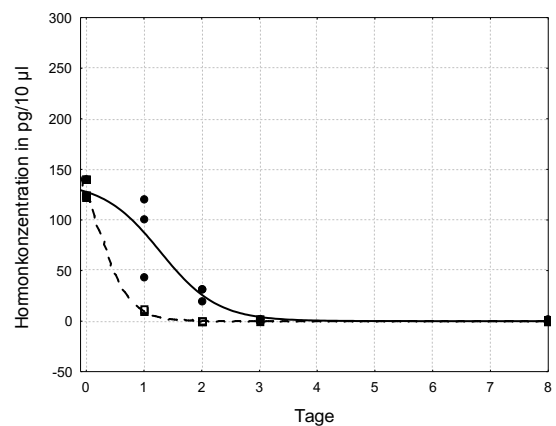
Versuchssreihe FW I, Platte 1



Versuchssreihe FW II, Platte 3



Versuchssreihe FW III, Platte 5

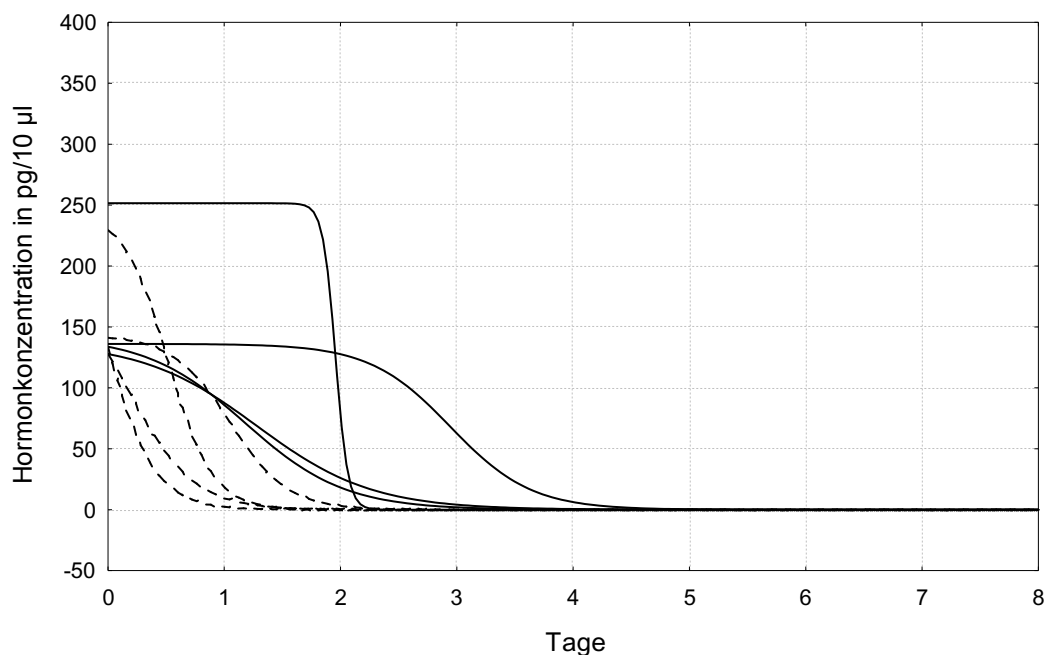


Versuchssreihe FW IV, Platte 7

**Abb. 4.1 Versuchsserien FW I-IV: Verlauf der Testosteronkonzentration über 28 Tage im Flusswasser bei 5°C (—●—) und bei 20°C (---□---); Tage der Probenentnahme 0, 1, 2, 3, 8, 14, 28 (Darstellung bis Tag 8); Einzelwerte**

Die Abbildung 4.1 zeigt, dass das dem Flusswasser zugefügte Testosteron innerhalb von 3 Tagen fast vollständig abgebaut war. Eine Ausnahme bildete der 5 C-Ansatz der Versuchssreihe FW II, bei dem eine ähnlich niedrige Testosteronkonzentration am 4. Tag vermutet werden kann.

Zusätzlich zeichnet sich ab, dass der Konzentrationsabfall bei der Aufbewahrung bei 20 C schneller erfolgte, als bei der Aufbewahrung bei 5 C. Die Abbildung 4.2 zeigt die Verlaufskurven der 5 C - und 20 C - Versuchsansätze der vorher einzeln dargestellten Versuchsserien FW I-IV. Alle vier Verlaufskurven der 20 C – Versuchsansätze erreichen früher ein Testosteronkonzentrationsminimum, als die vier Verlaufskurven der 5 C – Versuchsansätze.



**Abb. 4.2** Versuchsreihen FW I-IV: Gegenüberstellung der Verlaufskurven der Versuchsansätze Testosteron im Flusswasser bei 5°C-Lagerung (—) und bei 20°C-Lagerung (- - -) über 28 Tage (Darstellung bis Tag 8)

Die bakteriologische Untersuchung des Flusswassers ergab am Ausgangstag eine Koloniezahl zwischen 35 und 70 KbE/ml. In der Versuchsreihe FW II erfolgte im 5 C-Ansatz eine Keimvermehrung um zwei Zehnerpotenzen, während die Koloniezahlen der anderen 5 C-Ansätze weitgehend konstant blieben. In den Ansätzen, die bei 20 C gelagert wurden, fand bis auf den der Versuchsreihe FW IV eine deutliche Keimvermehrung um eine bis drei Zehnerpotenzen statt (Anhang Tabelle 9.2).

#### 4.1.1.2 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser

Im vorausgegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Testosteron im Flusswasser einem Abbau unterliegt und eine zugeführte Menge bei Lagerungstemperaturen von 5 C und 20 C innerhalb von 2 bis 4 Tagen auf ein Minimum reduziert wird. Als Kontrolle für die Hypothese, dass Mikroorganismen im Flusswasser für diesen Abbau verantwortlich sind, wurden parallel gleich aufgebaute Versuchsansätze mit sterilisiertem Flusswasser durchgeführt. Für die Messung der OD-Werte waren die sterilen 5 C-Ansätze der Versuchsreihen FW I-IV gemeinsam mit den unsterilen Ansätzen ihrer Versuchsreihe auf einer Mikrotiterplatte platziert. Die sterilen 20 C-Ansätze wurden auf anderen Mikrotiterplatten gemessen (siehe auch Tabelle 3.5).

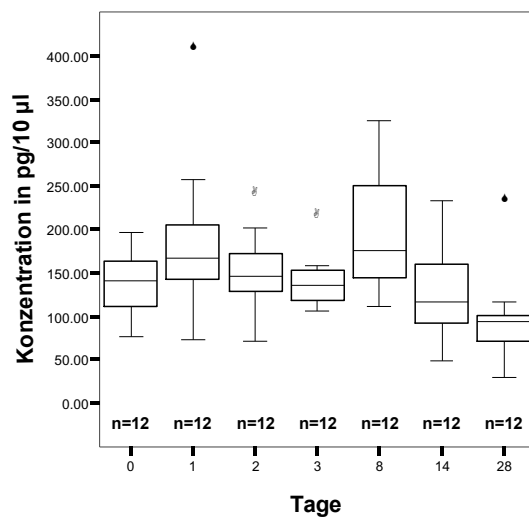


Die Untersuchungen zeigten bis zum 28. Tag bei allen sterilen Ansätzen ein Absinken der Testosteronkonzentration. Bei der 5 °C-Lagerung fiel sie von 140 pg/10 µl auf 92 pg/10 µl in der Versuchsreihe FW I (Anhang Tabelle 9.4), von 165,9 pg/10 µl auf 100,7 pg/10 µl in Versuchsreihe FW II (Anhang Tabelle 9.6), in Versuchsreihe FW III von 87,2 pg/10 µl auf 45,2 pg/10 µl (Anhang Tabelle 9.8) und von 152,5 pg/10 µl auf 71,9 pg/10 µl in der Versuchsreihe FW IV (Anhang Tabelle 9.10). Das entspricht einem verbliebenen Testosterongehalt von 66 % (Versuchsreihe FW I), 61 % (FW II), 52 % (FW III) und 47 % (FW IV) am 28. Tag.

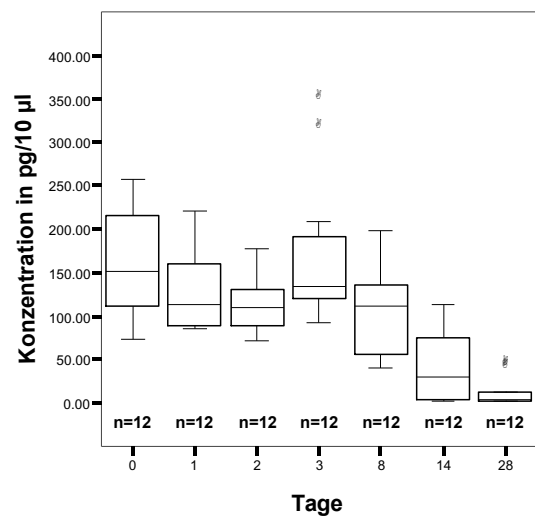
Bei der 20 °C-Lagerung sank die Testosteronkonzentration stärker ab, so dass bei den Versuchsreihen FW II, III und IV am 28. Tag und bei den Versuchsreihen FW II und III auch schon am 14. Tag Konzentrationen von deutlich unter 10 pg/10 µl gemessen wurden (Anhang Tabellen 9.6, 9.8, 9.10). In der Versuchsreihe FW I fiel der Testosterongehalt bis zum 28. Tag von anfänglich 146,9 pg/10 µl auf 40,3 pg/10 µl, was einem verbliebenen Testosterongehalt von 27 % entspricht (Anhang Tabelle 9.4). Es scheint also die Lagerungstemperatur einen Einfluss auf die Stabilität des Testosterons zu haben.

Abbildung 4.3 soll einen Überblick über die ermittelten Konzentrationswerte bei den jeweiligen Lagerungstemperaturen geben. Dazu wurden die Einzelwerte der vier Versuchsansätze bei 5 °C- bzw. bei 20 °C-Lagerung eines Entnahmetages zusammen mit Hilfe von Boxplots dargestellt (n=12).

Die Sterilität wurde bei allen Ansätzen zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Lagerung überprüft. Bei der Versuchsreihe FW II wurde ab der Mitte des Versuchs ein Keimwachstum nachgewiesen. Bei den anderen Versuchsreihen blieb die Sterilität während der Lagerung erhalten.



Lagerung bei 5 C



Lagerung bei 20 C

**Abb. 4.3 Versuchsreihen I-IV: Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser über 28 Tage bei 5°C- und bei 20°C-Lagerung (Einzelwerte); Tage der Probenentnahme 0, 1, 2, 3, 8, 14, 28**

#### 4.1.1.3 Verlauf der Testosteronkonzentration im Aqua bidest.

Wie schon oben erwähnt, sollte dieser Versuchsansatz einen möglichen Einfluss abiotischer Faktoren in sterilisiertem Flusswasser auf Testosteron abklären. Die Lagerungstemperatur von 20 C wurde mit der Annahme gewählt, dass eventuelle Veränderungen der Testosteronkonzentration unter abiotischen Verhältnissen bei höherer Temperatur deutlicher erkennbar werden.

Die Proben der Versuchsansätze Testosteron in sterilisiertem Flusswasser bei 20 C und Testosteron im Aqua bidest. einer Versuchsreihe waren zur Bestimmung der Testosteronkonzentration auf derselben Mikrotiterplatte platziert, wo sie einer Dreifachbestimmung unterzogen wurden (siehe auch Tabelle 3.5). Zur Betrachtung der Ergebnisse wurde der hieraus ermittelte Medianwert herangezogen.

In den Versuchsreihen FW I, II und IV fiel der Testosterongehalt bis zum 14. Tag um ca. 10 % (Versuchsreihen FW I und IV) bis 20 % (Versuchsreihe FW II) ab. In der Versuchsreihe FW III lag der Medianwert am Tag 14 mit 189,3 pg/10 µl höher, als am Ausgangstag (118,8 pg/10 µl), wobei die Einzelwerte hier zwischen 15,6 pg/10 µl und 298,8 pg/10 µl stark schwankten (Anhang Tabellen 9.4, 9.6, 9.8, 9.10).

Der Testosterongehalt in den Ansätzen mit Aqua bidest. blieb bis zum 14. Tag weitgehend konstant (Anhang Tabelle 9.11). Im Gegensatz dazu waren in den Versuchsansätzen mit sterilisiertem Flusswasser am 14. Tag deutlich niedrigere Konzentrationen nachzuweisen (siehe Tabelle 4.1). Neben dem mikrobiellen Abbau des Testosterons scheinen also auch abiotische Faktoren im Flusswasser einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Testosteron zu haben.

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

**Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der Medianwerte der Ansätze Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (2) und Testosteron im Aqua bidest. (3) nach einer und nach zwei Wochen**

Versuchsreihe FW	Ansatz	Lagerungs- temperatur	Probenentnahme am Tag					
			0		7		14	
			Median	%	Median	%	Median	%
I	3	20 C	158,84	100	148,18	93,29	145,66	91,7
II	3	20 C	126,11	100	102,67	81,41	97,72	77,49
III	3	20 C	118,83	100	143,93	121,12	189,26	159,26
IV	3	20 C	160,57	100	160,57	100	141,95	88,4
I	2	20 C	146,91	100	133,88	91,13	96,63	65,78
II	2	20 C	79,81	100	45,67	57,22	6,71	8,41
III	2	20 C	154,32	100	184,67	119,66	1,37	0,89
IV	2	20 C	194,75	100	132,34	67,95	59,65	30,63

% = Prozent vom Ausgangswert

Median = Medianwert aus Dreifachbestimmung

#### 4.1.2 Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser über 6 Tage (Versuchsreihen FW V-VII)

In Kapitel 4.1.1.1 konnte gezeigt werden, dass der Testosterongehalt in den unsterilen Versuchsansätzen der Versuchsreihen FW I-IV innerhalb weniger Tage auf ein Minimum abfiel. Die anschließenden Versuchsreihen FW V-VII ermöglichen eine genauere Darstellung des Verlaufs der Testosteronkonzentration, indem kürzere Probenintervalle gewählt wurden. Die Versuchsreihen wurden Ende August und Anfang September angesetzt (Anhang Tabelle 9.1). Eine Versuchsreihe bestand aus zwei Versuchsansätzen:

Ansatz 1: Flusswasser mit Testosteron

Ansatz 2: sterilisiertes Flusswasser mit Testosteron

Die Probenentnahme erfolgte bei diesen Versuchsreihen sechs Tage lang täglich morgens und an den Tagen 1, 2 und 3 zusätzlich ein zweites Mal am Nachmittag. Die Lagerung erfolgte ausschließlich bei 5 °C. Wie bei den Versuchsreihen FW I-IV wurden auch hier Dreifachbestimmungen durchgeführt. Beide Ansätze einer Versuchsreihe waren auf denselben Mikrotiterplatten platziert (siehe auch Tabelle 3.5).

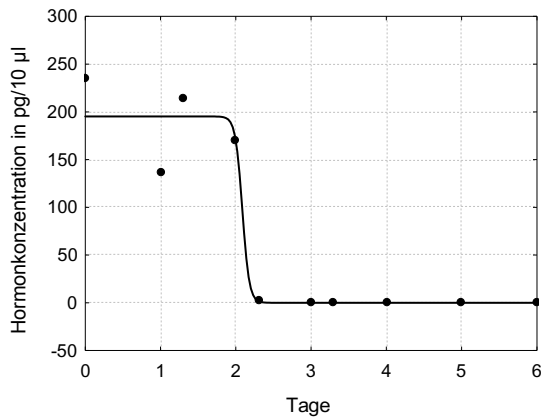
#### **4.1.2.1 Verlauf der Testosteronkonzentration in nicht sterilisiertem Flusswasser**

Abbildung 4.4 zeigt die drei Verlaufskurven der Versuchsreihen FW V-VII, die mittels der Mediane errechnet wurden. Die drei Verlaufskurven stellen sich sehr ähnlich dar. Die Versuchsreihe FW V startete mit einem Ausgangswert von 236 pg/10 µl und zeigte bis zum Morgen am Tag 2 einen leichten Abfall der Testosteronkonzentration. Bis zur Probenentnahme am Nachmittag des zweiten Tages sank die Konzentration dann rapide von 170 pg/10 µl auf 1,8 pg/10 µl ab. Bis zum Nachmittag des dritten Tages war die Konzentration auf einen Wert < 1 pg/10 µl abgesunken (Anhang Tabelle 9.13).

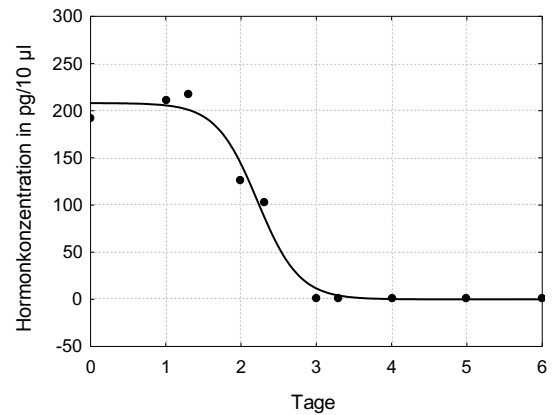
Der Ausgangswert der Versuchsreihe FW VI betrug 171,7 pg/10 µl. Davon ausgehend zeigte sich bis zum Nachmittag des ersten Entnahmetages ein stetiger, leichter Konzentrationsanstieg auf 215,4 pg/10 µl. Bis zum Morgen des zweiten Entnahmetages war die Konzentration dann auf 112,1 pg/10 µl und bis zum Nachmittag auf 4,9 pg/10 µl abgesunken. Nachdem am Morgen des dritten Tages noch eine Testosteronkonzentration von 6,3 pg/10 µl gemessen werden konnte, war diese bis zum Nachmittag auf 1,1 pg/10 µl und bis zum 4. Tag auf einen Wert < 1 pg/10 µl gefallen (Anhang Tabelle 9.15).

Auch bei der Versuchsreihe FW VII ist ein leichter Anstieg der Testosteronkonzentration vom Zeitpunkt des Ansetzens mit 192,6 pg auf 216,4 pg/10 µl bis zum Nachmittag des ersten Entnahmetages festzustellen. Nachdem am zweiten Tag morgens und nachmittags Werte von etwas über 100 pg/10 µl gemessen wurden, lag die Testosteronkonzentration am Morgen des dritten Entnahmetages dann bei 1,1 pg/10 µl und an den folgenden Tagen < 1 pg/10 µl (Anhang Tabelle 9.17).

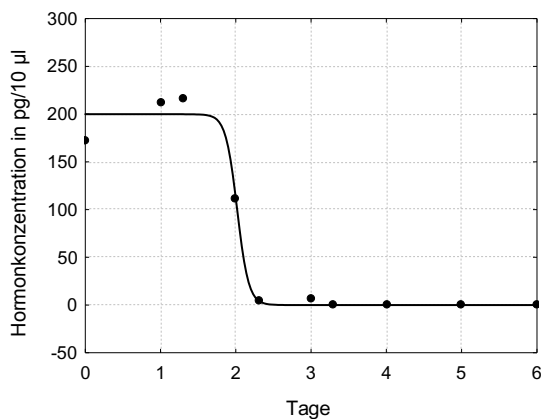
Abbildung 4.4 macht deutlich, dass nach einer Plateauphase bis zum Nachmittag des ersten Tages, während der ein leichtes Absinken (Versuchsansatz FW V) bzw. ein leichter Anstieg (Versuchsansätze FW VI und VII) der Testosteronkonzentration festzustellen war, ein starker Konzentrationsabfall bis zum Erreichen eines Konzentrationsminimum von < 5 % vom Ausgangswert am Nachmittag von Tag 2 (FW V und VI) bzw. am Morgen von Tag 3 (FW VII) erfolgte.



Versuchssreihe FW V, Platte 13



Versuchssreihe FW VII, Platte 15



Versuchssreihe FW VI, Platte 14

**Abb. 4.4 Versuchsserien FW V-VII: Verlauf der Testosteronkonzentration (Medianwerte) über 6 Tage im Flusswasser bei 5 °C; Probenentnahme erfolgte täglich morgens, an den Tagen 1 - 3 wurde zusätzlich nachmittags eine Probe entnommen**

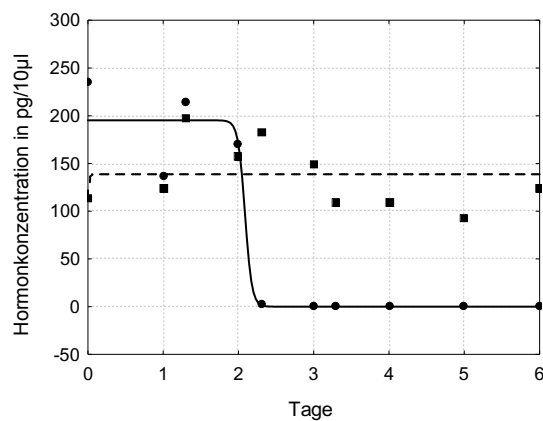
Die Koloniezahlen betragen am Ausgangstag  $10^2$  in der Versuchssreihe FW V und  $10^3$  in den Versuchsserien FW VI und VII. Während der Keimgehalt in der Versuchssreihe FW V bis zum Tag 6 um zwei Zehnerpotenzen stieg, blieb er in den beiden anderen Versuchsserien konstant (Anhang Tabelle 9.2).

#### 4.1.2.2 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser

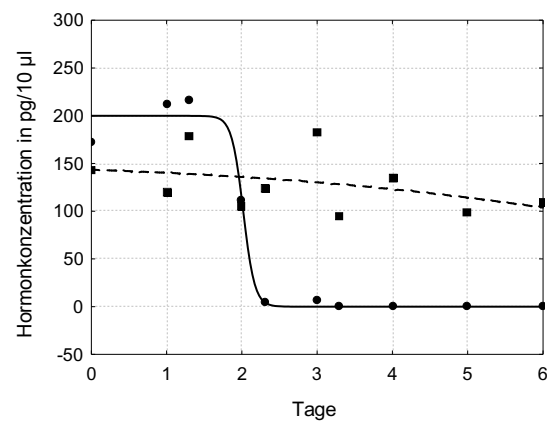
Bei den Messungen der Versuchsserien FW V-VII konnte bis zum 6. Tag bei den sterilen Ansätzen kein signifikanter Abfall der Testosteronkonzentration festgestellt werden. Es wurden hier am Tag 6 Testosteronkonzentrationen gemessen, die einem Hormongehalt von 110 % (Versuchssreihe FW V), 76 % (FW VI) und 89 % (FW VII) bezüglich ihres

jeweiligen Ausgangswertes entsprachen. Dabei schwankten die ermittelten Konzentrationen im Verlauf des Versuches zwischen 81 % und 174 % (FW V), 66 % und 128 % (FW VI) und 64 % und 143 % (FW VII) vom Ausgangswert (siehe auch Anhang Tabellen 9.14, 9.16, 9.18). Die Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch die Versuchsreihen FW V und VI mit dem jeweiligen Verlauf der Testosteronkonzentrationen im unsterilen und sterilen Versuchsansatz.

Bei allen Ansätzen wurde am 6. Tag ein Keimwachstum nachgewiesen.



Versuchsreihe FW V, Platte 13



Versuchsreihe FW VI, Platte 14

**Abb. 4.5 Versuchsreihen FW V und VI: Verlauf der Testosteronkonzentration (Medianwerte) über 6 Tage im Flusswasser (—●—) und in sterilisiertem Flusswasser (- -■- -) bei 5 °C; Probenentnahme erfolgte täglich morgens, an den Tagen 1 - 3 wurde zusätzlich nachmittags eine Probe entnommen**

#### 4.1.3 Zusammenfassung der Versuchsreihen FW I-VII

In den Versuchsreihen FW I-IV wurde festgestellt, dass Testosteron im Flusswasser einem Abbau unterliegt. Bei einer Lagerung von 20 °C wurden bei den Versuchsreihen FW I, III und IV nach einem Tag sehr niedrige Konzentrationen und bei allen Versuchsreihen am 2. Tag ein Konzentrationsminimum von < 5 % vom Ausgangswert nachgewiesen. Bei 5 °C wurde ein deutlicher Konzentrationsabfall nach der Probenentnahme am Tag 1 und ein Konzentrationsminimum am Tag 3 festgestellt (siehe Kapitel 4.1.1.1).

Die Versuchsreihen FW V-VII zeigten, dass bei einer 5 °C-Lagerung der hauptsächliche Konzentrationsabfall des Testosterons nach dem Nachmittag des ersten Tages erfolgte

und ein Konzentrationsminimum von < 5 % vom Ausgangswert am Nachmittag von Tag 2 (FW V und VI) bzw. am Morgen von Tag 3 (FW VII) erreicht wurde (siehe Kapitel 4.1.2.1). In der Zeit, in der in den unsterilen Versuchsansätzen der Abbau des zugeführten Testosterons erfolgte, konnte in den sterilen Versuchsansätzen kein vergleichbares Absinken der Testosteronkonzentration festgestellt werden. Im späteren Verlauf des Versuchs fiel der Testosterongehalt aber auch hier ab, wobei dies im Fall der Lagerung bei 20 °C schneller erfolgte (siehe Kapitel 4.1.1.2).

Die Ergebnisse der Ansätze mit Aqua bidest. weisen auf abiotische Faktoren im Flusswasser hin, die einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Testosteron zu haben scheinen (siehe Kapitel 4.1.1.3).

#### **4.2 Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV)**

Während der Versuche zum Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser konnten aus dem verwendeten Flusswasser die drei Bakterienspezies *Alcaligenes faecalis* (AF), *Aeromonas sobria* (AS) und *Citrobacter freundii* (CF) isoliert werden. Folgende Untersuchungen sollten zeigen, ob eines dieser Bakterien eine direkte Wirkung auf das Testosteron hat. Dazu wurden pro Bakterium vier Versuchsreihen (Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV) durchgeführt, die jeweils aus zwei Versuchsansätzen bestanden:

Ansatz 1: sterilisiertes Flusswasser mit einer Bakteriensuspension und Testosteron

Ansatz 2: sterilisiertes Flusswasser mit Testosteron (Kontrollansatz)

Die Versuchsreihen I und II wurden im Juni, die Versuchsreihen III und IV im September angesetzt (Anhang Tabelle 9.19). Die Lagerung beider Ansätze erfolgte bei 20 °C. An den Tagen 0, 1, 2, 5, 7, 15 und 28 und bei den Versuchsreihen III und IV zusätzlich an den Tagen 6 und 8 wurden Proben zur Bestimmung des Testosterongehaltes entnommen. Zur Messung der Werte waren bei den Versuchsreihen I und II auf derselben Mikrotiterplatte die drei Ansätze 1 pro Versuchsreihe der verschiedenen Bakterien platziert. Bei den Ansätzen 2 wurden jeweils die Versuchsreihen I und II eines Bakteriums auf derselben Mikrotiterplatte gemessen. Bei den Versuchsreihen III und IV wurden jeweils Ansatz 1 und Ansatz 2 einer Versuchsreihe auf derselben Mikrotiterplatte gemessen (siehe auch Tabelle 3.5). Die Proben wurden einer Dreifachbestimmung unterzogen. Zur Betrachtung der Ergebnisse wurde der hieraus ermittelte Medianwert herangezogen.

#### **4.2.1 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis* – Suspension (Versuchsreihen AF I-IV)**

In der Versuchsreihe AF I (Ansatz 1) blieb die Testosteronkonzentration trotz Schwankungen bis zum 7. Tag mit 166,6 pg/10 µl bei einem Ausgangswert von 161,3 pg/10 µl relativ konstant. Bis zum 28. Tag fiel sie auf 4,7 pg/10 µl ab. Die Versuchsreihe AF II (Ansatz 1) startete mit einer Testosteronkonzentration von 186,6 pg/10 µl. Am 7. Tag wurden noch 115,3 pg/10 µl nachgewiesen. Die ermittelten Werte schwankten bis dahin zwischen 119,8 pg/10 µl und 162,6 pg/10 µl (Tag 5). Bis zum 15. Tag fiel der Testosterongehalt deutlich auf 57,3 pg/10 µl (31 %) und bis zum 28. Tag weiter auf 18,4 pg/10 µl (10 %) ab (Anhang Tabelle 9.21). In Versuchsreihe AF III (Ansatz 1) hielt sich die Testosteronkonzentration bis zum 6. Tag auf einem hohen Niveau. An den Tagen 7 und 8 wurden dann Werte um 65 pg/10 µl (ca. 27 %) gemessen. Es folgten Messungen von 15,9 pg/10 µl (7 %) am 15. Tag und 3,7 pg/10 µl (1,6 %) am 28. Tag (siehe Anhang Tabelle 9.23). In Versuchsreihe AF IV (Ansatz 1) fiel die Testosteronkonzentration nur wenig ab. Am 28. Tag wurden noch 105,4 pg/10 µl gemessen, was bei einem Ausgangswert von 146,8 pg/10 µl einem verbliebenem Testosterongehalt von 72 % entspricht (Anhang Tabelle 9.24).

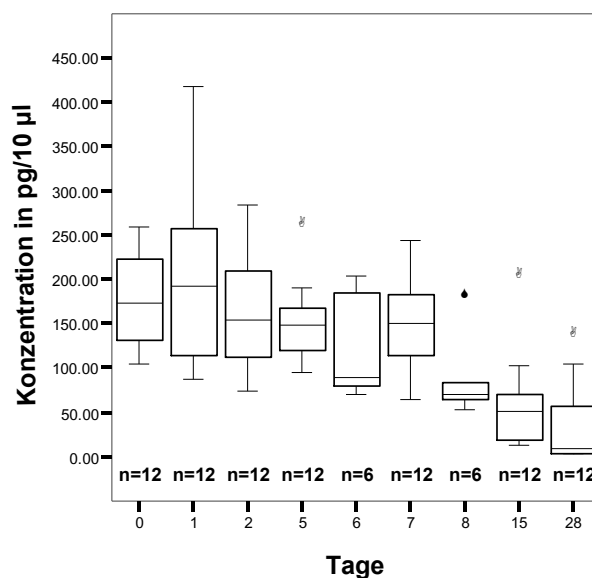
Im Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AF I hielt sich die Testosteronkonzentration bis zum Tag 7 (245,8 pg/10 µl) auf einem hohen Niveau. Bis zum 28. Tag fiel die Konzentration auf 22,5 pg/10 µl (9,5 % vom Ausgangswert), wobei bereits am 15. Tag mit 106,7 pg/10 µl nur noch 45 % vom Ausgangswert nachgewiesen wurden. Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AF II zeigte einen weitgehend konstanten Testosterongehalt bis zum 15. Tag mit gemessenen 198,8 pg/10 µl bei einem Ausgangswert von 227,8 pg/10 µl. Am 28. Tag wurden nur noch 26,8 pg/10 µl (12 %) nachgewiesen (Anhang Tabelle 9.22). Der Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AF III startete mit einem hohen Ausgangswert von 316,5 pg/10 µl. Bis zum 8. Tag blieb die Testosteronkonzentration auf einem Niveau von ca. 150 pg/10 µl konstant, um bis zum 15. Tag auf 17,5 pg/10 µl (5,5 %) und schließlich auf 4,4 pg/10 µl (1,4 %) am Tag 28 abzufallen (Anhang Tabelle 9.23). Im Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AF IV blieb die Testosteronkonzentration über den gesamten Zeitraum konstant hoch, so dass am 28. Tag noch 345,9 pg/10 µl nachgewiesen werden konnten. Der Ausgangswert betrug hier 237 pg/10 µl (Anhang Tabelle 9.24).

Es nahm also in allen Versuchsreihen im Ansatz 1 die Testosteronkonzentration bis zum 28. Tag ab. Dabei wurden am 28. Tag bei den Versuchsreihen AF I, II und III Werte von



unter 10 % vom Ausgangswert gemessen. Der größte Abfall erfolgte zwischen dem 7. und dem 28. Tag (siehe Abb. 4.6, Anhang Tabellen 9.21, 9.23, 9.24). In den sterilen Kontrollansätzen (Ansatz 2) der Versuchsreihen AF I, II und III nahm die Testosteronkonzentration bis zum 28. Tag in vergleichbarer Weise ab (Anhang Tabellen 9.22 und 9.23). Als typischer Verlauf werden in Abbildung 4.7 Ansatz 1 und 2 der Versuchsreihe AF III dargestellt. Eine leichte Tendenz zu einer langsameren oder geringeren Abnahme des Testosterongehaltes zeigten die Kontrollansätze der Versuchsreihen AF II und IV (Anhang Tabellen 9.22 und 9.24).

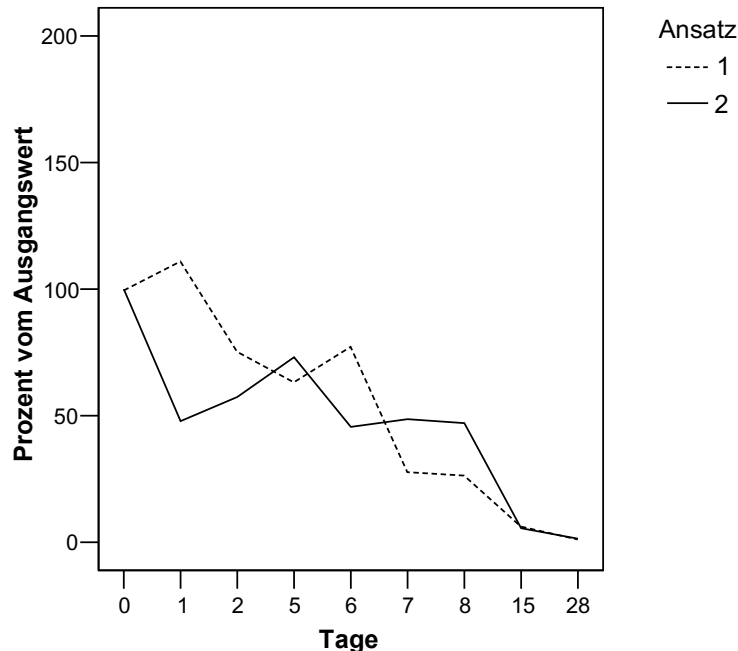
Bereits bei den Versuchsreihen FW I-IV zeigte sich in den sterilen Ansätzen 2 bei einer 20 °C-Lagerung ein deutlicher Konzentrationsabfall des Testosterons auf Werte bis zu unter 10 % vom Ausgangswert am 28. Tag (siehe Kapitel 4.1.1.2).



**Abb. 4.6 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis* – Suspension über 28 Tage bei 20 °C; Zusammenfassung aller ermittelten Werte aus Ansatz 1 der Versuchsreihen AF I-IV; Tage der Probenentnahme 0, 1, 2, 5, 7, 15, 28; zusätzlich an Tag 6 und 8 bei den Versuchsreihen AF III und IV**

Die Versuchsreihen I und II wurden mit demselben Wasser durchgeführt, die Versuchsreihen III und IV mit jeweils anderem (Anhang Tabelle 9.19). Die Koloniezahlen in den Ansätzen 1 betragen zu Beginn  $10^9$  (Versuchsreihen I und II),  $10^7$  (Versuchsreihe III) und  $10^6$  (Versuchsreihe IV). Sie veränderten sich bis zum Ende des Versuchs um ein bis zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 9.20). Die Ansätze 2 der Versuchsreihen

I und II wurden im Laufe des Versuchs mit Umgebungskeimen verunreinigt. Bei den Ansätzen 2 der Versuchsreihen III und IV blieb die Sterilität über den Versuchszeitraum erhalten.



**Abb. 4.7 Versuchsreihe AF III: Beispielhafter Verlauf der Testosteronkonzentration über 28 Tage bei 20 °C in sterilem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis* – Suspension (Ansatz 1) und in sterilem Flusswasser (Ansatz 2), Platte 38; die Medianwerte wurden in Prozentwerte vom Ausgangswert (= 100 %) umgerechnet**

#### 4.2.2 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria* – Suspension (Versuchsreihen AS I-IV)

Die Versuchsreihe AS I (Ansatz 1) startete mit 156,2 pg/10 µl. Bis zum 7. Tag blieb der Testosteron Gehalt konstant. Am 15. Tag wurden noch 79,5 pg/10 µl (51 % vom Ausgangswert) und am 28. Tag 50,7 pg/10 µl (32 %) nachgewiesen. In Versuchsreihe AS II (Ansatz 1) blieb der Testosteron Gehalt bis zum 15. Tag etwa gleich hoch, wohingegen am 28. Tag mit 91,8 pg/10 µl eine etwas niedrigere Konzentration gemessen wurde (Ausgangswert 138,4 pg/10 µl) (Anhang Tabelle 9.25). Der Ausgangswert der Versuchsreihe AS III (Ansatz 1) betrug 159 pg/10 µl. Bis zum 8. Tag hielt sich der Testosteron Gehalt auf etwa der Hälfte des Ausgangswertes. Am Tag 15 wurden noch 53,3 pg/10 µl (33,5 % vom Ausgangswert) und am 28. Tag 49,6 pg/10 µl gemessen (Anhang Tabelle 9.27). In Versuchsreihe AS IV (Ansatz 1) betrug der Ausgangswert

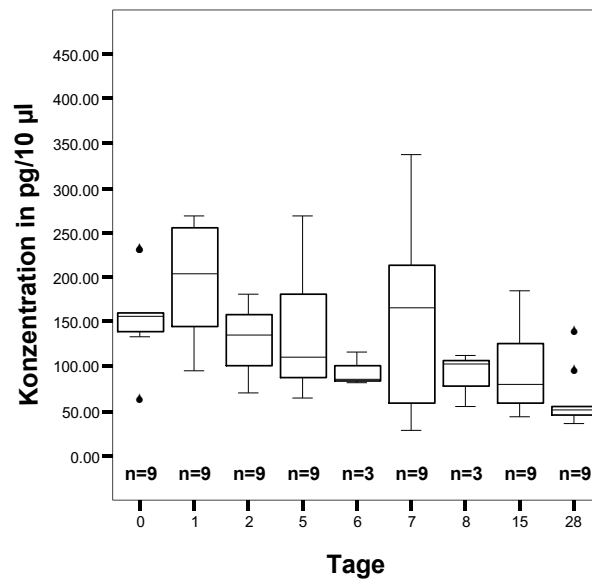
15,4 pg/10 µl. Bis zum 8. Tag wurden Werte zwischen 3,1 pg/10 µl und 5,7 pg/10 µl und an den Tagen 15 und 28 Werte um 2 pg/10 µl gemessen (Anhang Tabelle 9.28).

Die Ansätze 2 (Kontrollansätze) der Versuchsreihen AS I und II blieben über den Untersuchungszeitraum konstant. So wurden Ausgangswerte von 49,6 pg/10 µl (Versuchsreihe AS I) und 58 pg/10 µl (Versuchsreihe AS II) und am 28. Tag noch 59 pg/10 µl (Versuchsreihe AS I) und 64,5 pg/10 µl (Versuchsreihe AS II) gemessen (Anhang Tabelle 9.26). Der Ausgangswert des Ansatzes 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AS III betrug 105,8 pg/10 µl. Am 28. Tag wurden noch 78,7 pg/10 µl gemessen. Die Medianwerte schwankten während des Versuchs zwischen 47,3 pg/10 µl (Tag 1) und 115,6 pg/10 µl (Tag 8) (Anhang Tabelle 9.27). Auch im Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe AS IV schwankten die ermittelten Testosteronkonzentrationen, wobei der Ausgangswert (4,2 pg/10 µl) einer der unteren Werte war. Der Höchstwert war 10,6 pg/10 µl am Tag 15. Am 28. Tag wurden 7 pg/10 µl gemessen (Anhang Tabelle 9.28).

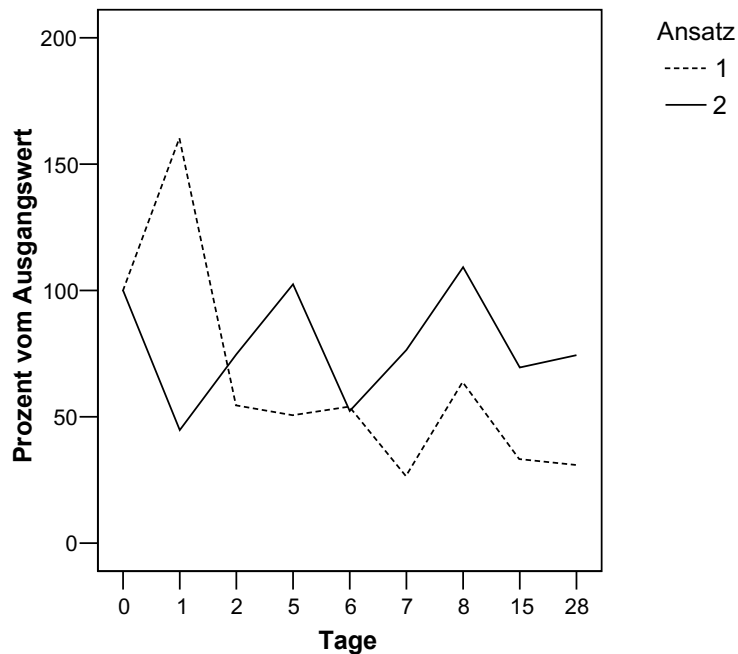
In allen Ansätzen 1 fiel die Testosteronkonzentration bis zum 28. Tag ab. Am Tag 28 waren zwischen 12 % (AS IV) und 66 % (AS II) vom Ausgangswert nachweisbar (Anhang Tabellen 9.25, 9.27, 9.28). Abbildung 4.8 fasst die ermittelten Einzelwerte für Ansatz 1 der Versuchsreihen AS I-III zusammen.

In den Ansätzen 2 erfolgte im Gegensatz zu den Ansätzen 2 der Versuchsreihen AF I-IV (siehe 4.2.1) und der Versuchsreihen FW I-IV (siehe 4.1.1.2) kein deutlicher Abfall der Testosteronkonzentration (Anhang Tabellen 9.26 - 9.28). Als typischer Verlauf werden in Abbildung 4.9 Ansatz 1 und 2 der Versuchsreihe AS III dargestellt.

Die Versuchsreihen AS I und II und die Versuchsreihen AS III und IV wurden jeweils mit demselben Wasser durchgeführt (Anhang Tabelle 9.19). Die Koloniezahlen in den Ansätzen 1 betrugen zu Beginn  $10^8$  (Versuchsreihen AS I und II) und  $10^4$  (Versuchsreihe AS III und IV). Sie veränderten sich bis zum Ende des Versuchs um bis zu zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 9.20). Die Ansätze 2 der Versuchsreihen AS I und II wurden im Laufe des Versuchs mit Umgebungskeimen verunreinigt. Bei den Ansätzen 2 der Versuchsreihen AS III und IV blieb die Sterilität über den Versuchszeitraum erhalten.



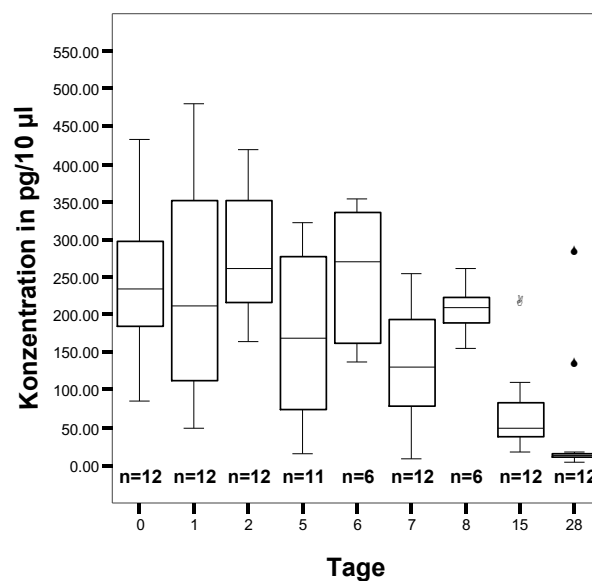
**Abb. 4.8** Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria* – Suspension über 28 Tage bei 20 °C; Zusammenfassung aller ermittelten Werte aus Ansatz 1 der Versuchsreihen AS I-III; Tage der Probenentnahme 0, 1, 2, 5, 7, 15, 28; zusätzlich an Tag 6 und 8 bei der Versuchsreihe AS III



**Abb. 4.9** Versuchsreihe AS III: Beispielhafter Verlauf der Testosteronkonzentration über 28 Tage bei 20 °C in sterilem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria* – Suspension (Ansatz 1) und in sterilem Flusswasser (Ansatz 2), Platte 36; die Medianwerte wurden in Prozentwerte vom Ausgangswert (= 100 %) umgerechnet

#### 4.2.3 Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii* – Suspension (Versuchsreihen CF I-IV)

In Versuchsreihe CF I (Ansatz 1) wurde ein Ausgangswert von 216,3 pg/10 µl gemessen. Am Tag 28 betrug der Medianwert 131,3 pg/10 µl. Im Verlauf des Versuchs unterlagen die Werte hier zwischen den einzelnen Tagen und auch innerhalb der Dreifachbestimmung eines Tages starken Schwankungen. Auch in Versuchsreihe CF II traten Schwankungen auf, die aber nicht so stark ausgeprägt waren, wie in Versuchsreihe CF I. Hier fiel der Testosterongehalt im Ansatz 1 von 224,5 pg/10 µl auf 10,4 pg/10 µl am 28. Tag. Am 15. Tag war mit 33,8 pg/10 µl bereits eine deutliche Abnahme ersichtlich (Anhang Tabelle 9.29). In der Versuchsreihe CF III hielt sich der Testosterongehalt im Ansatz 1 bis Tag 8 auf einem hohen Niveau. Am 15. Tag wurden nur noch 66 pg/10 µl und am 28. Tag 10,5 pg/10 µl nachgewiesen (Anhang Tabelle 9.31). In der Versuchsreihe CF IV (Ansatz 1) verlief es ähnlich. Am 28. Tag wurden nur noch 14,9 pg/10 µl festgestellt, nachdem der Medianwert bis zum 8. Tag zwischen 176,7 pg/10 µl und 374,4 pg/10 µl pendelte und am 15. Tag noch 93,2 pg/10 µl gemessen wurden (Anhang Tabelle 9.32).



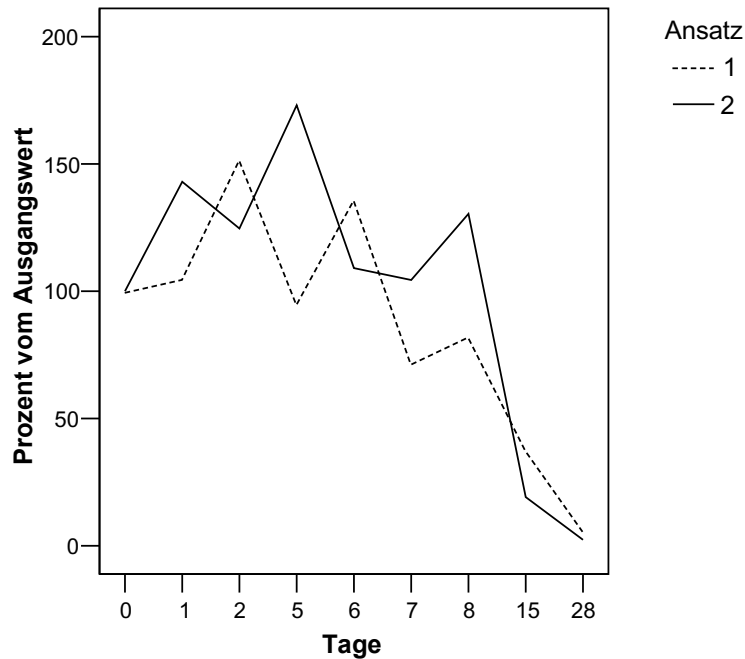
**Abb. 4.10** Verlauf der Testosteronkonzentration in sterilem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii* – Suspension über 28 Tage bei 20 °C; Zusammenfassung aller ermittelten Werte aus Ansatz 1 der Versuchsreihen CF I-IV; Tage der Probenentnahme 0, 1, 2, 5, 7, 15, 28; zusätzlich an Tag 6 und 8 bei den Versuchsreihen CF III und IV

Der Ansatz 2 (Kontrollansatz) der Versuchsreihe CF I enthielt am Ausgangstag 276,1 pg Testosteron/10 µl. Bis Tag 7 wurden Werte über 200 pg/10 µl gemessen. Am 28. Tag betrug der Medianwert 58,7 pg/10 µl. In der Versuchsreihe CF II wurden im Ansatz 2 bis zum 15. Tag konstant hohe Testosteronkonzentrationen nachgewiesen. Am 28. Tag betrug der Medianwert 127,6 pg/10 µl, was einem Testosterongehalt von 62 % vom Ausgangswert entspricht (Anhang Tabelle 9.30). Im Kontrollansatz (Ansatz 2) der Versuchsreihe CF III blieb der Testosterongehalt bei einem Ausgangswert von 155,2 pg/10 µl bis zum Tag 8 (184,7 pg/10 µl) stabil. Ab dem 15. Tag wurden dann Werte unter 20 pg/10 µl nachgewiesen (Anhang Tabelle 9.31). In Versuchsreihe CF IV verhielt es sich ebenso. Hier betrug der Ausgangswert 135,5 pg/10 µl. Am 15. Tag wurden 25,9 pg/10 µl und am 28. Tag dann noch 3,2 pg/10 µl nachgewiesen (Anhang Tabelle 9.32).

In den Ansätzen 1 der Versuchsreihen CF II, III und IV fiel der Testosterongehalt zum Ende des Versuchs auf unter 10 % vom Ausgangswert ab (Anhang Tabellen 9.29, 9.31, 9.32). Bereits am 15. Tag wurde hier ein deutlicher Rückgang des Testosterongehaltes sichtbar. Der größte Abfall erfolgte dabei zwischen dem 8. und dem 28. Tag (siehe Abb. 4.10). In den Ansätzen 2 (Kontrollansätze) nahm die Testosteronkonzentration vergleichbar deutlich ab (Anhang Tabellen 9.30 – 9.32). Als typischer Verlauf werden in Abbildung 4.11 Ansatz 1 und 2 der Versuchsreihe CF IV dargestellt.

Bereits bei den Versuchsreihen FW I-IV zeigte sich in den sterilen Ansätzen 2 bei einer 20 C-Lagerung ein deutlicher Konzentrationsabfall des Testosterons auf Werte bis zu unter 10 % vom Ausgangswert am 28. Tag (siehe Kapitel 4.1.1.2).

Die Versuchsreihen CF I und II und die Versuchsreihen CF III und IV wurden jeweils mit demselben Wasser durchgeführt (Anhang Tabelle 9.19). Die Koloniezahlen in den Ansätzen 1 betrugen zu Beginn  $10^8$  (Versuchsreihen CF I und II) und  $10^6$  (Versuchsreihe CF III und IV). Sie veränderten sich bis zum Ende des Versuchs um bis zu zwei Zehnerpotenzen (Anhang Tabelle 9.20). Die Ansätze 2 der Versuchsreihen CF I und II wurden im Laufe des Versuchs mit Umgebungskeimen verunreinigt. Bei den Ansätzen 2 der Versuchsreihen CF III und IV blieb die Sterilität über den Versuchszeitraum erhalten.



**Abb. 4.11** Versuchsreihe CF IV: Beispielhafter Verlauf der Testosteronkonzentration über 28 Tage bei 20 °C in sterilem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii* – Suspension (Ansatz 1) und in sterilem Flusswasser (Ansatz 2), Platte 41; die Medianwerte wurden in Prozentwerte vom Ausgangswert (= 100 %) umgerechnet

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Versuchsreihen AS/AF/CF I-IV

Die vorausgegangenen Kapitel zeigen in den Versuchsansätzen mit einer Bakteriensuspension eine deutliche Abnahme der Testosteronkonzentration zum Ende des Versuchs. Dabei wurden am 28. Tag bei mehr als der Hälfte der Versuchsreihen Werte von unter oder nahe 10 % vom Ausgangswert gemessen (AF I - III, AS IV, CF II – IV). Der größte Abfall erfolgte zwischen dem 7. und dem 28. Tag.

Die Charakteristik der Abnahme ähnelt aber nicht dem Konzentrationsabfall der Versuchsreihen FW I-IV Ansatz 1 (Testosteron im Flusswasser), in denen bei einer 20 C-Lagerung bereits ab dem 2. Tag Werte von < 5 % vom Ausgangswert nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 4.1.1.1). Vielmehr ist sie vergleichbar mit der festgestellten Abnahme der Testosteronkonzentration in den sterilen Kontrollansätzen (Ansatz 2), sowie der bei 20 C gelagerten sterilen Versuchsansätze 2 der Versuchsreihen FW I-IV zum Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser, bei denen am 28. bzw. bereits am 14. Tag ebenfalls sehr niedrige Testosterongehalte gemessen wurden (siehe Kapitel 4.1.1.2).

#### **4.3 Vergleich der Konzentrationsverläufe von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser (Versuchsreihen H I-II)**

Dieser Versuch wurde zweimal im Januar durchgeführt. Zwischen den Wasserentnahmen für die zwei Versuchsreihen (H I, H II) lag eine Woche (Anhang Tabelle 9.33). Dem Flusswasser wurde Testosteron, Östron und Progesteron zugefügt und die Mischung anschließend bei 5 °C aufbewahrt. Zur Überwachung der Hormonkonzentrationen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen Proben entnommen (siehe Kapitel 3.1.3). Zur Bestimmung des Hormongehaltes wurden pro Mikrotiterplatte die Proben einer Hormon-Verlaufskurve gemessen. Zwischen den verschiedenen Hormon-Verlaufskurven traten große Schwankungen bezüglich der Ausgangswerte auf. Da die Untersuchungen auf das Abfallverhalten der jeweiligen Hormonkonzentration abzielten, wurden zur Darstellung die Medianwerte in Prozent vom Ausgangswert umgerechnet.

Die Versuchsreihe H I ist in der Abbildung 4.12 und in den Tabellen 9.34 - 9.36 (Anhang) dargestellt.

Bis zum dritten Tag blieb die Testosteronkonzentration in etwa konstant. Anschließend fiel sie bis zur Probenentnahme am fünften Tag auf ein Minimum ab.

Der Gehalt an Östron blieb bis zum 13. Tag auf einem Niveau um 100 %. Am 14. Tag waren noch 50 % der Ausgangsmenge nachzuweisen und am 28. Tag waren schließlich noch 2,3 % vom Ausgangswert messbar.

Die Progesteronkonzentration hielt sich bis zum 10. Tag zwischen 100 und 150 % vom Ausgangswert und fiel zum 11. Tag auf ca. 15 % ab. Am folgenden Tag wurde eine ähnliche Konzentration gemessen. An den Tagen 13 und 14 waren noch etwa 5 %, am 28. Tag 2,3 % nachzuweisen.

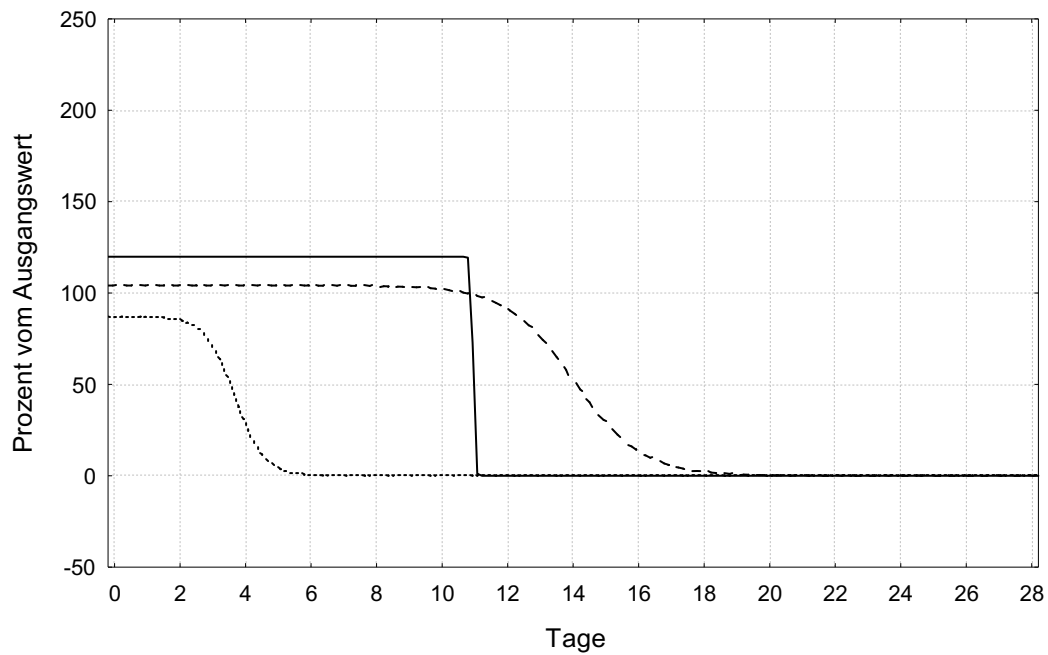
Die Versuchsreihe H II ist in der Abbildung 4.13 und in den Tabellen 9.37 - 9.39 (Anhang) dargestellt.

Der Testosterongehalt hielt sich bis zum Nachmittag des zweiten Tages auf einem hohen Niveau um die 200 % vom Ausgangswert. Zwischen dem Nachmittag des zweiten und dem Nachmittag des dritten Tages fiel die Konzentration dann auf ein Minimum ab.

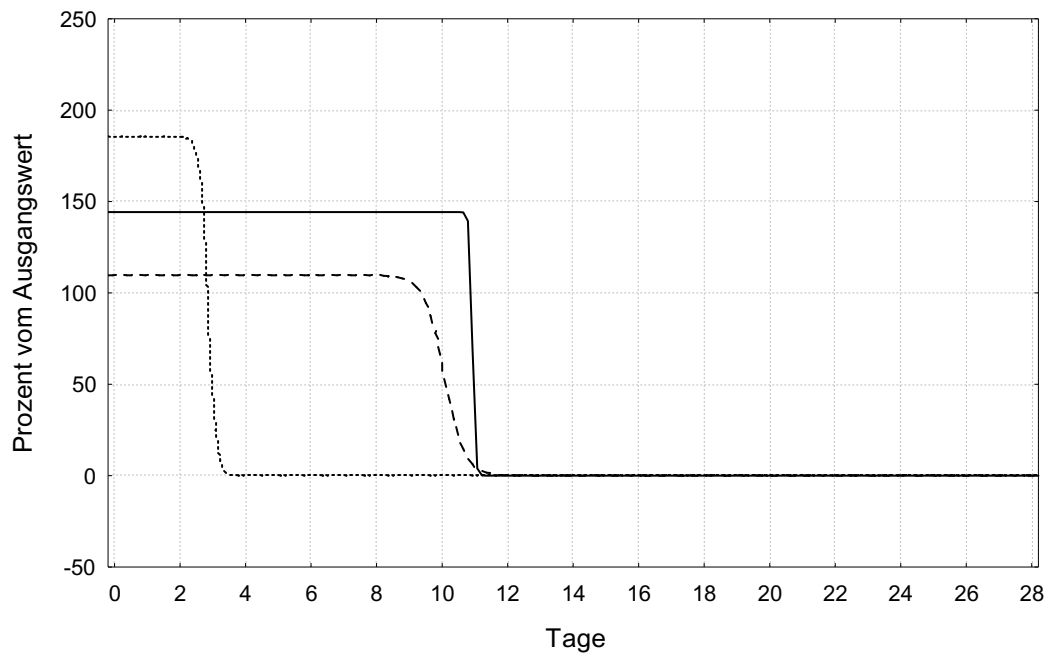
Die Östronkonzentration hielt sich bis zum Tag 9 auf dem Anfangsniveau. Am 10. Tag waren noch etwa 60 %, ab dem 11. Tag nur noch weniger als 10 % des Ausgangswertes nachzuweisen.

Der Verlauf der Progesteronkonzentration ist dem des ersten Durchlaufes sehr ähnlich. Auch hier gab es einen deutlichen Abfall der Konzentration nach dem 10. Tag, wonach sie sich an den Tagen 11 und 12 bei etwa 20 % vom Ausgangswert hielt. An den folgenden Tagen wurden nur noch Werte unter 5 % gemessen.





**Abb. 4.12 H I: Vergleich der Konzentrationsverläufe von Testosteron (····), Östron (----) und Progesteron (—) im Flusswasser über 28 Tage bei 5 °C**



**Abb. 4.13 H II: Vergleich der Konzentrationsverläufe von Testosteron (····), Östron (----) und Progesteron (—) im Flusswasser über 28 Tage bei 5 °C**

## 5 Diskussion

### 5.1 Abbau von Testosteron im Flusswasser

Dieser Arbeit lagen die Fragestellungen zugrunde, ob Testosteron im Flusswasser durch darin lebende Mikroorganismen abgebaut wird, ob aus dem verwendeten Flusswasser isolierte Bakterien in der Lage sind, Testosteron allein abzubauen und wie schnell Testosteron im Vergleich zu den anderen Geschlechtshormonen Progesteron und Östron, der ersten Abbaustufe des 17 $\beta$ -Östradiol, abgebaut wird.

Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Empfehlungen der OECD (1993, 2001) zur Prüfung der Biodegradibilität von organischen Substanzen über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt und mehr als zweimal wiederholt. Nach der Feststellung, dass Testosteron unter den gegebenen Versuchsbedingungen innerhalb der ersten drei Tage abgebaut wird, wurden weitere Versuchsreihen über 6 Tage mit kürzeren Probenintervallen durchgeführt, um einen genaueren Verlauf des Testosteronabfalls zu erhalten.

Um den Abbau durch Mikroorganismen zu bestätigen und den Einfluss abiotischer Faktoren des Flusswassers auszuschließen, wurden parallel zu den Versuchen zum Konzentrationsverlauf von Testosteron im Flusswasser auch die Testosteronkonzentrationen in sterilisiertem Flusswasser und in Aqua bidest. untersucht. Die Versuchsansätze wurden während des Versuchszeitraums in Dunkelheit aufbewahrt, um eine mögliche Photodegradation oder Verdunstung auszuschließen.

Im Flusswasser fiel die Testosteronkonzentration innerhalb von drei Tagen auf ein Minimum von < 5 % vom Ausgangswert. Der Verlust des Testosterons wird dem Abbau durch Mikroorganismen zugeschrieben, da die Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser im gleichen Zeitraum nicht abfiel. In vergleichbaren Versuchen konnte bereits ein biologisch-enzymatischer Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol, Östron (Giese, 2004) und Progesteron (Lindemann, 2005) im Flusswasser nachgewiesen werden. Auch Jürgens et al. (2002) beschreiben für Ethinylöstradiol und 17 $\beta$ -Östradiol im Flusswasser eine Reduzierung durch Biodegradation. Barel-Cohen et al. (2006) stellten in einem Fluss über eine Länge von 25 km einen Abfall von Testosteron fest und schrieben dies unter anderem bakteriellen Prozessen zu.

Der Abfall der Testosteronkonzentration erfolgte bei 20 C schneller als bei 5 C. Bei 20 C war bereits nach einem Tag der Großteil abgebaut und am 2. Tag wurde ein Minimum von < 5 % vom Ausgangswert erreicht. Bei 5 C Wassertemperatur erfolgte der

größte Konzentrationsabfall vom 2. auf den 3. Tag, an dem das Minimum von < 5 % vom Ausgangswert erreicht wurde. Die Geschwindigkeit des Abbaus von Testosteron im Flusswasser variiert also in Abhängigkeit von der Wassertemperatur. Auch Lorenzen et al. (2005) und Jacobsen et al. (2005) wiesen in verschiedenen Böden eine temperaturabhängige Biodegradation von Testosteron mit steigenden Abbauraten bei steigender Temperatur nach. Jacobsen et al. (2005) fanden im Boden bei Umgebungstemperaturen von 4 C und 12 C nach 96 Stunden Testosteron und Metabolite, wohingegen bei 30 C bereits nach 24 Stunden weder Testosteron noch Transformationsprodukte auffindbar waren. Auf vergleichbare Resultate kommen Lorenzen et al. (2005). Auch bei 17 $\beta$ -Östradiol, Östron und Progesteron zeigte sich die Wassertemperatur bezüglich der Abbaugeschwindigkeit als ein maßgebender Faktor. So stellte Giese (2004) eine Reduzierung der Östronkonzentration um über 90 % bei einer Wassertemperatur von 5 C nach 21 bis 42 Tagen, bei 20 C nach 6 bis 14 Tagen und bei 30 C nach 2 bis 14 Tagen fest. Progesteron erwies sich als weniger stabil. Bei einer Lagerungstemperatur von 20 C fiel die Konzentration bereits am 1. Tag auf unter 10 % vom Ausgangswert, während dies bei 5 C etwa am 6. Tag der Fall war (Lindemann, 2005). Jürgens et al. (2002) ermittelten Halbwertszeiten von 0,2 bis 9 Tagen für 17 $\beta$ -Östradiol und Östron im Flusswasser bei 20 C. Betrug die Lagerungstemperatur 10 C dauerte der Abbau ungefähr doppelt so lange.

Die Versuchsreihen über 6 Tage bei 5 C zeigten eine Plateauphase der Testosteronkonzentration bis zum Nachmittag des ersten Tages bzw. den Morgen des zweiten Tages und einen anschließenden schnellen Abfall bis zum Minimum am Nachmittag des 2. bzw. Morgen des 3. Tages. Lorenzen et al. (2005) stellen in ihren Versuchen zum Abbau von Testosteron in Erde einen schnellen Abfall ohne Plateauphase fest. Auch Stumpe und Marschner (2007) beschreiben den Abbau von Testosteron in verschiedenen Böden bei 20 C in den ersten drei Tagen als exponentiell mit einem anschließenden starken Abfall der Abbaurate, woraufhin kaum noch eine Mineralisation bis zum Ende des Versuchs stattfindet.

Im sterilisierten Flusswasser erfolgte bis zum 28. Tag ebenfalls bei allen Ansätzen ein Absinken der Testosteronkonzentration. Am Ende des Versuchszeitraums betrug der verbliebene Testosterongehalt bei der 5 C-Lagerung zwischen 47,18 % und 65,72 % vom Ausgangswert. Bei der 20 C-Lagerung sank die Testosteronkonzentration stärker ab, so dass bei den Ansätzen 2 der Versuchsreihen FW II, III und IV (sterilisiertes Flusswasser mit Testosteron) am 28. Tag und bei den Versuchsreihen FW II und III auch

schon am 14. Tag Konzentrationen von deutlich unter 10 pg/10 µl gemessen wurden. In den Ansätzen mit Aqua bidest. bei 20 °C erfolgte bis zum 14. Tag auch ein Rückgang der Testosteronkonzentration, der aber mit 10 – 20 % Verlust geringer ausfiel. Dies könnte als Hinweis gedeutet werden, dass die Stabilität von Testosteron im Flusswasser auch durch abiotische Faktoren in Abhängigkeit von der Wassertemperatur beeinflusst wird.

Auch in den Untersuchungen von Lindemann (2005) zur Abbaubarkeit von Progesteron im Flusswasser zeigten sich in einigen sterilen Versuchsansätzen am 28. Tag verminderte Progesteronkonzentrationen, wobei dies bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C eine deutlichere Ausprägung zeigte (20 °C: 50 % - 84 %; 5 °C: 62 % - 88 % der Progesteronkonzentration vom Ausgangswert). Lindemann (2005) führt einen möglichen chemischen Einfluss auf das Progesteronmolekül als Ursache an. Lorenzen et al. (2005) inkubierten sterilisierte Erde mit Testosteron bei 30 °C und stellten einen langsamen Abfall des Testosterongehaltes über 52 Stunden und eine gleichzeitige Ansammlung von 4-Androsten-3,17-dion fest, fanden aber keine signifikanten Anzeichen einer vollständigen Mineralisation des Testosterons. Colucci et al. (2001), die den Abbau von Östrogenen in der Erde untersuchten, fanden, dass die Umwandlung von 17β-Östradiol zu Östron sowohl in unsteriler als auch in steriler Erde erfolgte und gehen von einer abiotischen Transformation aus, wohingegen der weitere Abbau des Östrons an das Vorhandensein von Mikroorganismen gebunden ist. Eine Umwandlung des Testosterons in Androstendion könnte den Abfall der Testosteronkonzentration in den sterilen Ansätzen erklären, da der verwendete Enzymimmunoassay nicht für Androstendion empfindlich ist.

Während der Versuche zum Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser wurden aus dem verwendeten Flusswasser die drei Bakterienspezies *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas sobria* und *Citrobacter freundii* isoliert. Alle drei Bakterienarten sind ubiquitär vorkommende Umweltkeime, die unter anderem in Oberflächengewässern typischerweise anzutreffen sind. In Folgeuntersuchungen sollten sie auf ihre Fähigkeit geprüft werden, Testosteron solitär abzubauen. Dazu wurde das Flusswasser zunächst sterilisiert, anschließend Testosteron und eine entsprechende Bakteriensuspension zugefügt und bei 20 °C gelagert. Die Anzahl der Bakterienkolonien blieb über den Versuchszeitraum relativ konstant, so dass über den gesamten Zeitraum mit einem Abbau gerechnet werden konnte. Die Testosteronkonzentration nahm bei allen drei Bakterienspezies bis zum Ende des Versuchs ab. Ebenso nahm die Testosteronkonzentration in den sterilen Kontrollansätzen ohne Bakteriensuspension zum Ende des Versuchs ab. Die Charakteristik des Testosteronabfalls in den Ansätzen mit einer Bakteriensuspension ist dabei vergleichbar mit der Abnahme der Testosteronkonzentration in sterilisiertem

Flusswasser. Daraus wird gefolgert, dass die hier verwendeten Bakterienspezies nicht in der Lage sind, Testosteron allein abzubauen.

Lindemann (2005) konnte mit *Aeromonas sobria* ebenfalls keine Reduktion von Progesteron im Flusswasser herbeiführen und *Aeromonas hydrophila* zeigte in-vitro keinen Effekt auf die Konzentration von Östron (Giese, 2004). Schlenker et al. (1999 b) testeten den Einfluss von *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* auf Östron durch in-vitro-Versuche. Bei *Clostridium perfringens* deutete sich nach 48 Stunden und 42 C eine mikrobiell-enzymatische Metabolisierung des Östrons an. MacDonald et al. (1976) wiesen in *Clostridium perfringens* ein für den Steroidabbau zentrales Enzym, die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, nach. Dieses Enzym wurde auch in anderen ubiquitär in Böden und Gewässern vorkommenden Umweltkeimen gefunden. Hierzu gehören *Eubacterium species* (MacDonald et al., 1979; Mallonee et al., 1995), *Pseudomonas putida* (Uwajima et al., 1978) und *Comamonas testosteroni* (Boyer et al., 1965; Oppermann und Maser, 1996), dessen Degradation von Testosteron sehr detailliert erforscht ist (Talalay et al., 1952; Horinouchi et al., 2004). Fujii et al. (2002) und Yoshimoto et al. (2004) konnten aus Belebtschlamm eines Klärwerks Bakterienarten isolieren, die Östrogene in Reinkulturen biodegradieren können.

Neben der Möglichkeit, dass einzelne Bakterienspezies Steroidhormone als Kohlenstoffquelle nutzen und sie vollständig abbauen, wird von einer kometabolischen Verwertung von Steroiden durch Bakteriengemeinschaften ausgegangen (Alexander, 1981; Reinecke, 2001).

Beim Vergleich der im ersten Versuchskomplex ermittelten Abbaugeschwindigkeiten von Testosteron mit denen von 17 $\beta$ -Östradiol, Östron (Giese, 2004) und Progesteron (Lindemann, 2005) zeigt sich, dass der Abbau von Testosteron im Flusswasser bei 5 C und bei 20 C deutlich schneller als der von 17 $\beta$ -Östradiol oder Östron und bei 5 C deutlich schneller als der von Progesteron erfolgt. Im letzten Versuchskomplex wurden Testosteron, Östron und Progesteron gemeinsam in einer Flusswasserprobe bei 5 C inkubiert. Der Versuch wurde wiederholt. Die Fragestellung war, ob sich der schnellere Abbau von Testosteron bestätigt oder ob eventuell eine Konkurrenz zwischen den Hormonen eine Veränderung im Abbau bedingt. Erfolgt eine Kontamination von Gewässern mit Geschlechtshormonen menschlichen oder tierischen Ursprungs ist immer mit einem Gemisch aus mehreren zu rechnen, da sowohl androgene als auch östrogene Hormone und verschiedene ihrer Metabolite ausgeschieden werden.

Im ersten Durchlauf fiel die Testosteronkonzentration am 5. Tag auf ein Minimum ab. Ein Abfall der Östronkonzentration um ca. 50 % wurde nach 14 Tagen erreicht, am 28. Tag

waren 2,29 % vom Ausgangswert messbar. Im zweiten Durchlauf fiel die Testosteronkonzentration bis zum 3. Tag auf ein Minimum ab. Die Östronkonzentration fiel vom 9. auf den 10. Tag auf etwa 60 % des Ausgangswertes und ab dem 13. Tag waren weniger als 5 % nachzuweisen. Die Progesteronkonzentration fiel in beiden Versuchsdurchläufen von Tag 10 auf Tag 11 auf ca. 15 % bzw. 20 % vom Ausgangswert. An den folgenden Tagen sank sie unter 5 % vom Ausgangswert.

Der deutlich schnellere Abbau von Testosteron in Flusswasser bei 5 °C konnte bestätigt werden. Es wurde innerhalb von 3 bis 5 Tagen abgebaut, gefolgt von Progesteron mit Hormongehalten von ca. 5 % vom Ausgangswert nach 13 Tagen und Östron, das sich am stabilsten zeigte. Der Konzentrationsabfall des Östrons variierte mit minimalen Konzentrationen von weniger als 5 % vom Ausgangswert am 13. und 28. Tag. Bradley et al. (2009) stellten ebenfalls schnellere Abbauraten für Testosteron als für 17 $\beta$ -Östradiol und Östron in Flusssediment-Wasser-Gemischen fest. Auch Casey et al. (2004) und Jacobsen et al. (2005) konnten in der Erde einen deutlich schnelleren Abbau von Testosteron als von 17 $\beta$ -Östradiol nachweisen.

Giese (2004) beschreibt eine Reduktion der Östronkonzentration um mehr als 90 % in Flusswasser bei 5 °C nach 21 bis 42 Tagen. Jürgens et al. (2002) untersuchten ebenfalls den Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol in Flusswasser und berechneten bei 20 °C Halbwertszeiten zwischen einigen Stunden und 9 Tagen und einen um etwa die Hälfte reduzierten Abbau bei einer Wassertemperatur von 10 °C.

In den Untersuchungen von Lindemann (2005) fiel die Progesteronkonzentration bei einer Wassertemperatur von 5 °C zwischen dem 4. und 8. Tag auf Werte unter 5 pg/10  $\mu$ l Wasser. Der hier festgestellte Abfall der Progesteronkonzentration ist langsamer. Möglich wäre eine weniger aktive Bakterienpopulation im Flusswasser, aufgrund der Versuchsdurchführung im Winter. Jürgens et al. (2002) vermuten dies u. a. als einen Grund schnellerer Abbauraten von 17 $\beta$ -Östradiol im Sommer. Dagegen sprechen allerdings die Abbauraten von Testosteron und Östron, die keinen verlangsamten Verlauf im Vergleich mit vorausgegangenen Ergebnissen zeigen.

## **5.2 Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus**

Bei der Konzipierung der Versuche wurde den Erfahrungen von Giese (2004) und Lindemann (2005) bezüglich der Verminderung von Fehlerquellen bei der Messung und Auswertung von Konzentrationsverläufen von Steroidhormonen im Flusswasser Rechnung getragen. So wurden alle Proben einer Verlaufskurve auf einer Mikrotiterplatte platziert und Dreifachbestimmungen durchgeführt, wodurch pro Platte je nach

Fragestellung bis zu drei zu vergleichende Ansätze verbracht werden konnten. So konnte der Einfluss von Varianzen zwischen den verschiedenen Mikrotiterplatten reduziert werden. Für die Auswertung wurde der Medianwert herangezogen, um den Einfluss einzelner extremer Messfehler zu dämpfen. Desweiteren erfolgte die Kalibration der Werte der optischen Dichte (OD) und entsprechenden Konzentrationen in Anlehnung an Miethe et al. (2004) und Giese (2004) auf Grundlage einer logistischen Funktion, um eine möglichst hohe Genauigkeit in den äußeren Bereichen der Standardkurve zur Berechnung der Konzentration zu erreichen. Dies ist von Bedeutung, da in den Untersuchungen Konzentrationsverläufe gemessen wurden, die z. T. mit sehr hohen Konzentrationen beginnen und auf sehr niedrige Konzentrationen absinken.

Um den Verlauf der Testosteronkonzentration im Flusswasser darzustellen, wurde den Ergebnissen die logistische Funktion  $Konz = a / (1 + \exp(b + c \cdot \text{Zeit}))$  angepasst. Giese (2004) hatte in ihren Untersuchungen festgestellt, dass sich eine sigmoide Kurve nach einer logistischen Funktion im Gegensatz zu einer exponentiellen oder doppelt exponentiellen Funktion gut an die Daten des Östrogenabbaus im Flusswasser anpasst. Die Ergebnisse der Ansätze 1 der Versuchsreihen FW I-IV ließen eine sehr gute Anpassung der Funktion zu. Die Konzentrationsverläufe der übrigen Versuchsansätze entsprachen hingegen nicht dem sigmoidalen Modell, weshalb diese Ergebnisse mittels Boxplots und Prozentualverläufen dargestellt wurden.

Um die hier ermittelten Ergebnisse auf natürliche Verhältnisse in der Umwelt zu übertragen, müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. So wurde das Flusswasser über die Versuchsdauer in einem geschlossenen System gelagert. Während der Lagerung verändern sich die chemisch-physikalischen und die biologischen Eigenschaften des Wassers und damit die Lebensbedingungen für die Mikroorganismen (Currie, 1990; Pauli et al., 2001). Die Biozönose entspricht somit nach einer Lagerung nicht mehr derjenigen am Entnahmeort. Der Testosteronabbau erfolgte allerdings innerhalb der ersten drei Tage, so dass gravierende Veränderungen in dieser Zeit durch die Lagerung eher unwahrscheinlich sind.

Desweiteren stellt das Flusswasser ein offenes System dar, dass als Umweltkompartiment ständigen Änderungen unterliegt. Das hier verwendete Flusswasser entstammt der Spree aus dem Berliner Innenstadtbereich und bietet andere Bedingungen als z. B. naturbelassene Gewässer in ländlichen Gebieten.

Zur Versuchsdurchführung wurde ausschließlich Flusswasser mit Testosteron inkubiert. Testosteron adsorbiert an Sediment (Thomas et al., 2002; Lee et al., 2003; Casey et al.,

2004). Da im Versuchsaufbau eine Sedimentkomponente fehlt, können die Ergebnisse ausschließlich Aufschluss über die Verhältnisse in der Wassersäule geben.

### 5.3 Ökologisches Gefährdungspotential durch Testosteron

Zur Abschätzung der ökologischen Relevanz von Androgenen sind vorkommende Konzentrationen, Verbreitung und Persistenz entscheidend. Menschen, landwirtschaftliche Nutztiere und die Aquakultur sind beachtenswerte Eintragsquellen für natürliche und synthetische Steroidhormone.

In ungeklärten menschlichen Abwässern fanden Leusch et al. (2006 b) und Kirk et al. (2002) mit Konzentrationen von bis zu 9330 ng Testosteron-Äquivalenten (Teq) pro Liter im Mittel 50 bis 100fach höhere Gehalte an Androgenen als Östrogene. Dies ist bedingt durch höhere Produktionsraten und Blutplasmaspiegel von Androgenen beim Menschen (Siiteri und Febres, 1979). Gelängen Abwässer ohne vorherige Klärung in Gewässer, entspräche dies abhängig von Verdünnungsgrad und Abbau einer enormen Belastung für die darin lebenden Organismen, da natürliche Hormone höchst wirksam sind und bereits in Konzentrationen von wenigen ng/L Veränderungen vor allem bei aquatischen Lebewesen hervorrufen können (Kolodziej et al., 2003; Barel-Cohen et al., 2006).

Die Eliminierung von Androgenen in Kläranlagen zeigt sich von der Art der Abwasserbehandlung abhängig. Das Vorhandensein einer zweiten Klärstufe und insbesondere eine Abwasserreinigung mittels Belebtschlammverfahren (biologische Klärung) reduzieren Androgene bzw. androgene Aktivitäten enorm. Bei vorhandener zweiter Klärstufe werden Eliminierungsraten von 82 bis 100 % angegeben (Kirk et al., 2002; Thomas et al., 2002; Leusch et al., 2006 b), wobei die im Vergleich zu wirksamen Konzentrationen relativ hohen Nachweisgrenzen von 6,5 ng Testosteron-Äquivalente (Teq)/L (Leusch et al., 2006 b), 23 ng Dihydrotestosteron-Äquivalente (DHT)/L (Thomas et al., 2002) und 113 ng DHT/L (Kirk et al., 2002) zu berücksichtigen sind. Eine rein mechanische Klärung oder die biologische Klärung in Tropfkörperanlagen sind bezüglich der Eliminierung von Androgenen als ineffektiv einzustufen. Thomas et al. (2002) wiesen hier in Abflüssen Dihydrotestosteron-Äquivalente bis zu 635 ng DHT/L nach und Kirk et al. (2002) fanden in Abflüssen einer Kläranlage mit nur einer Klärstufe androgene Aktivitäten von bis zu 4033 ng DHT/L. Leusch et al. (2006 b) stellten lediglich eine Eliminierung von 57 % der zugeführten androgenen Aktivität durch Tropfkörperanlagen fest. Auch in Klärschlammproben wurden androgene Aktivitäten (im Mittel 543 ng/g TM) festgestellt, wenn keine aerobe Behandlung vorlag (Lorenzen et al., 2004).



Die Entsorgung der Ausscheidungen lebensmittelliefernder Nutztiere, die auch nach monatelanger Lagerung noch Steroidhormone enthalten (Schlenker et al., 1999 a; Lorenzen et al., 2004; Hakk et al., 2005), erfolgt üblicherweise über das Verbringen der Gülle bzw. des Mistes als Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Flächen. Auf diese Weise gelangen Androgene in den Boden, von wo sie bei Regenfällen in benachbarte Oberflächengewässer eingespült (Shore et al., 1995; Finlay-Moore et al., 2000; Shore et al., 2004; Soto et al., 2004; Jenkins et al., 2006) und / oder ins Grundwasser versickern können (Peterson et al., 2000; Kolodziej et al., 2004). Auch in Abflüssen von Weiden mit grasenden Rindern wurden nicht unerhebliche Androgenkonzentrationen gemessen (Shore et al., 2004; Jenkins et al., 2006). Im Boden zeigt Testosteron ein schwächeres Sorptionsverhalten als 17 $\beta$ -Östradiol (Sangsupan et al., 2006; Stumpe und Marschner, 2007). Casey et al. (2004) sehen das Risiko, dass Testosteron in tiefere Schichten, in denen die Biodegradation reduziert ist, vordringen kann und so die Möglichkeit der Belastung von Grundwasser zunimmt. Auch Shore et al. (2004) führen gemessene Testosteronpeaks ohne gleichzeitig messbare Östrogengehalte im oberen Jordan auf eine Anreicherung des Testosterons im Boden zurück, das im Gegensatz zu Östrogenen, die fest an Erdbestandteile gebunden sind, durch Regenfälle ausgespült werden kann. Im Labor wurden für Testosteron im Boden schnelle Abbauraten innerhalb weniger Tage ermittelt (Lee et al., 2003; Lorenzen et al., 2005; Jacobsen et al., 2005). Dabei zeigte sich der Abbau von verschiedenen Faktoren abhängig. Stieg der Gehalt an organischem Kohlenstoff (Lee et al., 2003), das Nährstoffangebot (Das et al., 2004) und/oder die Temperatur (Jacobsen et al., 2005; Lorenzen et al., 2005) erfolgte ein schnellerer Abbau. Auch der Feuchtigkeitsgrad der Erde beeinflusst die Degradation. In den Untersuchungen von Lorenzen et al. (2005) blieb das Testosteron in trockener Erde über den Versuchszeitraum von 120 Stunden erhalten.

Eine weitere direkte Kontaminationsquelle von Gewässern mit Steroidhormonen stellen Fischfarmen dar. In ihren Abflüssen wurden Östradiol, Testosteron und Androsteron in Konzentrationen von bis zu 10 ng/L nachgewiesen (Kolodziej et al., 2004; Shore et al., 2004; Barel-Cohen et al., 2006). Auch der Einsatz von Androgenen zur Erhöhung von Wachstumsraten ist denkbar. In Europa ist die Verabreichung von Stoffen mit hormoneller Wirkung an Tiere der Aquakultur ausschließlich zur sexuellen Inversion der Setzlinge innerhalb der ersten drei Monate erlaubt (96/22/EG). Europa deckt aber nur 4,4 % der globalen Aquakulturproduktion ab. Haupterzeuger ist Asien, insbesondere China, mit einem Anteil von über 90 % an der globalen Produktion aquatischer Organismen (Nikov und Smolka, 2003).

Eine Kontamination von Gewässern mit Testosteron besteht also. Das Ausmaß der Belastung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Je nach Wasservolumen, Fließgeschwindigkeit und Strömungsverhältnissen erfolgt eine Verdünnung und Verteilung. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Fähigkeit des Gewässers zur Selbstreinigung. Diese ist u. a. abhängig von der Zusammensetzung der Biozönose, vom Nährstoffangebot, Sauerstoffgehalt, Lichteinfall und von der Temperatur. Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, unterliegt Testosteron im Flusswasser einem relativ schnellen, temperaturabhängigen, biologisch-enzymatischem Abbau. Bei 20 °C war bereits nach einem Tag der Großteil abgebaut und am 2. Tag lagen bereits minimale Konzentrationen vor. Im Sommer ist somit eine schnelle Eliminierung von Testosteron im Flusswasser zu erwarten. Herrschen niedrigere Temperaturen, ist mit einer verlangsamten Abbaurate zu rechnen. Das hier festgestellte Erreichen minimaler Konzentrationen bei 5 °C Wassertemperatur am Nachmittag des 2. bzw. Morgen des 3. Tages impliziert aber auch dann eine rasche Eliminierung des Testosterons aus der Wassersäule. Vor diesem Hintergrund ist eine dauerhafte Persistenz in der Wassersäule und weitreichende Verbreitung von eingebrachtem Testosteron unwahrscheinlich. Gelangt Testosteron ins Grundwasser, ist aufgrund der dort geringeren mikrobiellen Belastung und niedriger Temperaturen, ein langsamerer Abbau zu vermuten (Giese et al., 2007).

Die in ihrer Molekülstruktur begründete Hydrophobie von Steroidhormonen lässt sie dazu neigen, in Gewässern an Sedimentpartikel zu binden (Thomas et al., 2002; Williams et al., 2003, Casey et al., 2004). So wiesen Thomas et al. (2002) im Sediment Androgenkonzentrationen von 1020-15300 ng DHT/kg und im Sedimentporenwasser bis zu 187 ng DHT/L nach. Dagegen enthielten die Proben aus der Wassersäule nur <2 bis 9 ng DHT/L. Dies trägt einerseits zu einer Reduzierung des Gehalts in der Wassersäule bei, andererseits allerdings besteht die Möglichkeit einer längerfristigen Belastung. Im Sediment herrscht oft ein anaerobes Milieu, was sich zusammen mit einem zugunsten sandiger Bestandteile eher niedrigen Gehalt an organischem Kohlenstoff ungünstig auf den Abbau von Steroidhormonen auswirkt. Somit besteht ein Risiko einer kontinuierlichen Belastung betroffener Gewässer durch Akkumulation und langsame Desorption von Androgenen über eine längere Zeitspanne. Laut Casey et al. (2004) nimmt in Boden-Wasser-Gemischen die Testosteronkonzentration in der wässrigen Phase zunächst innerhalb der ersten 5 Stunden ab, um dann mit der Zeit wieder anzusteigen. Sie vermuten als Grund Desorption oder die Anwesenheit von Metaboliten, die um die Sorptionsplätze konkurrieren oder eine geringere Sorptionsaffinität haben. Thomas et al. (2002) identifizierten Androstendion, Androstandion, Dehydrotestosteron, Androsteron und Epiandrosteron. In den Versuchen von Bradley et al. (2009) konnten in Sediment-

Wasser-Gemischen verschiedenener Flüsse, die Abwässer von Kläranlagen erhielten, für Testosteron Abbauraten von bis zu 30 % pro Tag bei 23 °C festgestellt werden. Unterhalb der Klärwerkszuläufe waren diese allerdings deutlich reduziert. Die Versuche wurden entsprechend der lokalen Verhältnisse im beprobten Flusssediment unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt sind deutlich potenzierte Wirkungen in Kombination mit anderen Stoffen. Gong et al. (2003) stellten bei Anwesenheit von Dihydrotestosteron (DHT) eine sprunghafte Erhöhung der androgenen Aktivität mariner Wasserproben von 3 % auf 200 bis 900 % von 0,1 nM DHT fest. In Untersuchungen an Muscheln schnellten die im Muschelgewebe gemessenen relativ geringen androgenen Aktivitäten von < 1 % von 0,1 nM DHT in Anwesenheit von DHT auf 112-340 %, wobei die Stärke des Anstiegs eine signifikant positive Korrelation zum Gehalt des Muschelgewebes an schwer abbaubaren organischen Schadstoffen aufwies (Bayen et al., 2004). Silva et al. (2002) zeigten, dass die hormonelle Aktivität in einem Stoffgemisch deutlich höher ist, als die Summe der einzelnen Stoffe es erwarten ließe. Dies ist besonders beachtenswert bezüglich der möglichen Bioakkumulation von Schadstoffen in Organismen und in der Futterkette.

Dem hier festgestellten relativ schnellen Abbau von Testosteron im Flusswasser stehen somit eine gewisse Persistenz durch die mögliche Adsorption von Testosteron an das Sediment und unvorhersehbare Wechselwirkungen mit anderen Schadstoffen gegenüber.

## 6 Zusammenfassung

Zahlreiche dokumentierte Störungen der Reproduktion und Geschlechtsentwicklung bei Menschen und Tieren, insbesondere bei solchen, die im Wasser leben, werden dem Einfluss hormonell wirksamer Substanzen in der Umwelt zugeschrieben. So genannte endokrine Disruptoren können von Menschen und Tieren aufgenommen werden und deren hormonelles Gleichgewicht stören. Neben verschiedenen Chemikalien, für die eine hormonelle Wirkung bekannt ist, nehmen endogene und synthetische Steroidhormone, die von Mensch und Tier ausgeschieden werden, aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit eine besondere Stellung ein. Sie gelangen direkt, mit den Abwässern oder über das Verbringen von Gülle, Mist und Klärschlamm auf landwirtschaftliche Flächen in Oberflächengewässer, Böden und Grundwässer.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Testosteron im Flusswasser durch darin lebende Mikroorganismen abgebaut wird, ob aus dem verwendeten Flusswasser isolierte Bakterien in der Lage sind, Testosteron allein abzubauen und wie schnell Testosteron im Vergleich zu den Geschlechtshormonen Progesteron und Östron abgebaut wird. Zum Nachweis des vermuteten biologisch-enzymatischen Abbaus wurde einer Wasserprobe aus der Spree Testosteron zugefügt und 28 bzw. 6 Tage bei 5 °C und bei 20 °C gelagert, wobei regelmäßig Proben entnommen und deren Konzentrationen mit einem Enzymimmunoassay bestimmt wurden. Als Kontrolle wurden sterilisiertes Flusswasser und Aqua bidest. mit Testosteron inkubiert. Die Fähigkeit verschiedener Bakterienspezies Testosteron solitär abzubauen wurde über 28 Tage bei 20 °C geprüft. Abschließend wurden Testosteron, Östron und Progesteron gemeinsam in einer Flusswasserprobe bei 5 °C inkubiert, um die Abbaugeschwindigkeiten bis zum 28. Tag direkt miteinander vergleichen zu können. Die Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

1. Testosteron wird im Flusswasser durch darin lebende Mikroorganismen abgebaut. Bei 20 °C war am 2. Tag ein Minimum von < 5 pg/10 µl erreicht, nachdem bereits nach einem Tag der Großteil abgebaut war. Bei 5 °C verringerte sich die Testosteronkonzentration bis zum Nachmittag des 1. Tages bzw. bis zum Morgen des 2. Tages nur gering. Bis zum Nachmittag des 2. bzw. Morgen des 3. Tages fiel sie dann schnell auf ein Minimum ab.
2. In sterilisiertem Flusswasser erfolgte ebenfalls ein Absinken der Testosteronkonzentration. Am 28. Tag waren bei der 5 °C-Lagerung zwischen

47,18 % und 65,72 % und bei der 20 °C-Lagerung zwischen 1,38 % und 27,44 % des Ausgangsgehaltes nachweisbar.

3. Ebenso erfolgte in Aqua bidest. bei 20 °C ein Rückgang der Testosteronkonzentration bis zum 14. Tag um 10 – 20 %. Der Konzentrationsabfall ist geringer als der in sterilisiertem Flusswasser bei 20 °C.
4. Bei der Inkubation von Testosteron mit den Bakterienspezies *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas sobria* und *Citrobacter freundii* erfolgte bis zum Ende des Versuchs eine Abnahme der Testosteronkonzentration. Die Charakteristik des Testosteronabfalls ist dabei vergleichbar mit der Abnahme der Testosteronkonzentration in sterilisiertem Flusswasser. Daraus wird gefolgert, dass die hier verwendeten Bakterienspezies nicht in der Lage sind, Testosteron allein abzubauen.
5. Der Abbau von Testosteron im Flusswasser erfolgt bei 5 °C deutlich schneller als der Abbau von Östron und von Progesteron. Minimale Testosteronkonzentrationen waren am 3. und am 5. Tag erreicht. Die Östronkonzentration fiel zwischen dem 11. und 28. Tag und die Progesteronkonzentration ab dem 13. Tag auf minimale Werte.
6. Das Gefährdungspotential durch Testosteron im Flusswasser ist eher gering einzuschätzen, da aufgrund der hier festgestellten relativ schnellen Abbauraten eine dauerhafte Persistenz von Testosteron in der Wassersäule unwahrscheinlich ist.

## 7 Summary

### Investigation of biodegradation of testosterone in surface water

Many dysfunctions of reproduction and sexual development in humans and especially in waterborne wildlife are caused to substances with endocrine impact. This endocrine disruptors can be ingest of men and animals and disturb their hormonal balance. Next to several chemicals and pesticides known as endocrine disruptors, the endogenous and synthetic sexhormones excreted by humans and animals are of especial concern because of their high effectivity. Steroidhormones reach surface waters, soils and groundwater in a direct way, with sewage or because of fertilizing fields with sludge.

The goals of this study were to determine if testosterone is degraded by microorganisms in river water, if *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas sobria* and *Citrobacter freundii*, isolated bacteria from the taken river water, are able to degrade testosterone on their own and to compare the rate of degradation of testosterone, progesterone and estrone, the first metabolite of 17 $\beta$ -estradiol. To evidence the supposed biodegradability of testosterone river water from the Spree was taken and stored over 28 days with testosterone at 5 C and 20 C. Over this time samples were taken to detect the concentration of testosterone. For control also aqua bidest. and sterilized river water were incubated with testosterone. The ability of some bacteria to degrade testosterone was investigated over 28 days at 20 C. Further testosterone, estrone and progesterone were incubated together in river water at 5 C. The results of these analyses were as follows:

1. Testosterone in river water is degraded by microorganisms. At a water temperature of 20 C a large part of the testosterone is degraded after one day and on second day the concentration of testosterone reaches a minimum of < 5 pg/10  $\mu$ l. At 5 C only a slight degree or a slight increase occurs until the afternoon on first day respectively the morning on second day. Until the afternoon on second day respectively the morning on third day the concentration of testosterone decreases fast to a minimum.
2. In sterilized river water also a dissipation of testosterone occurs. At the 5 C-storage between 47,18 % and 65,72 % from the initial concentration and at the 20 C-storage between 1,38 % and 27,44 % were detectable on the 28<sup>th</sup> day.

3. In aqua bidest. a decrease of 10-20 % in testosterone was detected until the 14<sup>th</sup> day at 20 C. This decline was slighter as the dissipation of testosterone in sterilized river water at a 20 C-storage.
4. The bacteria *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas sobria* and *Citrobacter freundii* cause a dissipation of testosterone until the end of the test. The characteristic of the decrease is comparable to the decrease of testosterone in sterilized river water. This leads to the conclusion that this species are not able to degrade testosterone on their own.
5. At 5 C the rate of degradation of testosterone in river water is significant faster than that of estrone and progesterone. The concentration of testosterone reaches a minimum on third and fifth day. The concentrations of estrone and progesterone reach a minimum between 11. and 28. day and on 13. day respectively.
6. The ecological risk exposure of testosterone in river water seems to be rather low, because of the rapid biodegradation no enduring persistence of testosterone in the water column may be expected.

## 8 Literaturverzeichnis <sup>1</sup>

- Adams, M. A., Teeter, J. H., Katz, Y., Johnson, P. B. (1987):  
Sex-pheromones of the Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*): Steroid studies. J Chem Ecol 13, 387-395.
- Alexander, M. (1981):  
Biodegradation of chemicals of environmental concern. Science 211, 132-138.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., Ternes, T. A. (2003):  
Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. Environ Sci Technol 37 (18), 4021-4026.
- Angus, R. A., McNatt, H., Howell, W., Peoples, S. (2001):  
Gonopodium Development in Normal Male and 11-Ketotestosterone-Treated Female Mosquitofish (*Gambusia affinis*): A Quantitative Study Using Computer Image Analyses. Gen Comp Endocrinol 123, 222-234.
- Angus, R. A., Weaver, S. A., Grizzle, J. M., Watson, R. D. (2002):  
Reproductive characters of male mosquitofish (*Gambusia affinis*) inhabiting a small southeastern US river receiving treated domestic sewage effluent. Environ Toxicol Chem 21 (7), 1404-1409.
- Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Earl Gray, L. (2003):  
Effects of the androgenic growth promotor 17- $\beta$ -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22 (6), 1350–1360.
- Aravindakshan, J., Paquet, V., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D. J., Cyr, D. G. (2004):  
Consequences of Xenoestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*). Toxicol Sci 78, 126-165.
- Atlas, R. M., Bartha, R. (1998):  
Microbial Ecology. Fundamentals and applications. 4. Auflage, Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park, Californien, Massachusetts, New York, 218-281, 332-385.
- Balter, M. (1999):  
Scientific cross-claims fly in the continuing beef war. Science 284, 1453-1455.
- Bamberg, E. (1994):  
Biochemie der gonadalen Steroidhormone. In: Döcke, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, 411-418.
- Bardin, W., Lipsett, M.B. (1968):  
Testosterone and Androstenedione Production and Interconversion Rates in Hirsute Women. In: Tamm, J. (Hrsg.): Testosterone; Proceedings of the Workshop Conference held from April 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup>, 1967 at Tremsbüttel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 226-231.

---

<sup>1</sup> Zeitschriftentitel-Abkürzungen gemäß List of journals indexed in Index Medicus, Bethesda, Md: Nat. Library of Medicine, 2005



- Barel-Cohen, K., Shore, L. S., Shemesh, M., Wenzel, A., Mueller, J., Kronfeld-Schor, N. (2006):  
Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. *J Environ Manage* 78, 16-23.
- Bayen, S., Gong, Y., Chin, H. S., Lee, H. K., Leong, Y. E., Obbard, J. P. (2004):  
Androgenic and Estrogenic Response of Green Mussel Extracts from Singapore's Coastal Environment Using a Human Cell-Based Bioassay. *Environ Health Perspect* 112 (15), 1467-1471.
- Bergeron, J., Ahmad, D., Barriault, D., Larose, A., Sylvestre, M. (1994):  
Identification and mapping of the gene translation products involved in the first step of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl / chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can J Microbiol* 40, 743-753.
- Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E. (1996):  
TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters* 50, 229-317.
- Bilitewski, B., Gehring, M., Tennhardt, L., Vogel, D., Weltin, D. (2002):  
Pro und Kontra stoffliche Klärschlammverwertung mit Blick auf endokrin wirksame Substanzen. In: Bilitewski/ Weltin/ Werner (Hrsg.): „Endokrin wirksame Substanzen in Abwasser und Klärschlamm - Neueste Ergebnisse aus Wissenschaft und Technik“, Beiträge zur Abfallwirtschaft/Altlasten Band 23, Tagungsband zum Workshop vom 22./23. April 2002 in Dresden, Eigenverlag des Forums für Abfallwirtschaft und Altlasten e.V. an der TU Dresden Außenstelle Pirna-Copitz, 6-20.
- Blount, B. C., Silva, M. J., Caudill, S. P., Needham, L. L., Pirkle, J. L., Sampson, E. J., Lucier, G. W., Jackson, R. J., Brock, J. W. (2000):  
Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 108 (10), 979-982.
- Bortone, S. A., Davis, W. P., Bundrick, C. M. (1989):  
Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bull Environ Contam Toxicol* 43 (3), 370-377.
- Boyer, J., Baron, D. N., Talalay, P. (1965):  
Purification and properties of a 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemistry* 4, 1825-1833.
- Bradley, P. M., Barber, L. B., Chapelle, F. H., Gray, J. L., Kolpin, D. W., McMahon, P. B. (2009):  
Biodegradation of 17 $\beta$ -Estradiol, Estrone and Testosterone in Stream Sediments. *Environ Sci Technol*, 43, 1902–1910.
- Busch, W., Ittrich, G. (1970):  
Bestimmung der Hormonproduktion des Hoden beim Eber zur Aufstellung von Parametern für die Beurteilung des endokrinen Funktionszustandes. *Endokrinol* 57, 125-138.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y. (2004):  
Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324, 55-66.

- Carlsen, E., Givercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. (1992):  
Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305, 609-613.
- Caruso, J. H., Suttkus, R. D., Gunning, G. E. (1988):  
Abnormal expression of secondary sex characteristics in a population of *Anguilla rostrata* (Pisces: Anguillidae) from a dark coloured Florida stream. *Copeia* 4, 1077-1079.
- Casey, F. X., Hakk, H., Simunek, J., Larsen, G. L. (2004):  
Fate and transport of testosterone in agricultural soils. *Environ Sci Technol* 38 (3), 790-798.
- Casey, F. X., Larsen, G. L., Hakk, H., Simunek, J. (2003):  
Fate and Transport of 17 $\beta$ -Estradiol in Soil-Water Systems. *Environ Sci Technol* 37 (11), 2400–2409.
- Choi, H. S. (1987):  
Immunologische Bestimmung von Sexualsteroiden zur Fertilitätskontrolle bei Rind, Schwein und Pferd. *Wien tierärztl Mschr* 74, 14-22 und 47-56.
- Cody, R. P., Bortone, S. A. (1997):  
Masculinization of Mosquitofish as an Indicator of Exposure to Kraft Mill Effluent. *Bull Environ Contam Toxicol* 58 (3), 429-436.
- Colborn T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. (1993):  
Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101 (5), 378-384.
- Colucci, M. S., Bork, H., Topp, E. (2001):  
Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone. *J Environ Qual* 30, 2070-2076.
- Comhaire, F., Waeleghem, K. V., De Clerk, N., Schoonjans, F. (1996):  
Declining sperm quality in European men. *Andrologia* 28, 300-301.
- Conner, A. H., Nagaoka, M., Rowe, J. W., Perlman, D. (1976):  
Microbial Conversion of Tall Oil Sterols to C<sub>19</sub> Steroids. *Appl Environ Microbiol* 32 (2), 310-311.
- Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. (2004):  
Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65, 995-1016.
- Coulter, A. W., Talaly, P. (1968):  
Studies on the microbiological degradation of steroid ring A. *J Biol Chem* 243, 3238-3247.
- Currie, D. J. (1990):  
Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorus. *Limnol Oceanogr* 35 (7), 1437-1455.

- Damgaard, I. N., Skakkebæk, N. E., Toppari, J., Virtanen, H. E., Shen, H., Schramm, K.-W., Petersen, J. H., Jensen, T. K., Main, K. M. and the Nordic Cryptorchidism Study Group (2006):  
Persistent Pesticides in Human Breast Milk and Cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 114 (7), 1133-1138.
- Das, B. S., Lee, L. S., Rao, P. S. C. Hultgren, R. P. (2004):  
Sorption and Degradation of Steroid Hormones in Soils during Transport: Column Studies and Model Evaluation. *Environ Sci Technol* 38 (5), 1460–1470.
- Davidson, J. M. (1977):  
Neurohormonal bases of male sexual behaviour. In: Greep, R.O. (Hrsg.): *Reproductive Physiology II. Int. Rev. of Physiol. Vol. 13.* University Park Press, Baltimore, 225-254.
- Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G., Anton-Culver, H. (1993):  
Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 101 (5), 372-377.
- Defraipont, M., Sorensen, P. W. (1993):  
Exposure to the pheromone 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one enhances the behavioral spawning success, sperm production and sperm motility of male goldfish. *Anim Behav* 46, 245-256.
- de Fur, P. L., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L. (1999):  
Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing, and assessment. *Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates, 12.-15. December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands.* SETAC Press, Pensacola.
- De Guise, S., Shaw, S. D., Barclay, J. S., Brock, J., Brouwer, A., Dewailly, E., Fair, P. A., Fournier, M., Grandjean, P., Guillette, L. J. Jr., Hahn, M. E., Koopman-Esseboom, C., Letcher, R. J., Matz, A., Norstrom, R. J., Perkins, C. R., Schwacke, L., Skaare, J. U., Sowles, J., St. Aubin, D. J., Stegeman, J., Whaley, J. E. (2001):  
Consensus Statement: Atlantic Coast Contaminants Workshop 2000. *Environ Health Perspect* 109 (12), 1301-1302.
- de Mora, S. J., Fowler, S. W., Cassi, R., Tolosa, I. (2003):  
Assessment of organotin contamination in marine sediments and biota from the Gulf and adjacent region. *Mar Pollut Bull* 46, 401-409.
- Denton, T. E., Howell, W. M., Allison, J. J., McCollum, J., Marks, B. (1985):  
Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 35, 627-632.
- Döcke, F. (1981):  
Keimdrüsen. In: Döcke, F. (Hrsg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie. 2. Aufl., Gustav Fischer, Jena, 393-499.*
- Döcke, F. (2000):  
Enzymimmunoassay. In: Wiesner, E., Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin. 4. Aufl., Enke, Stuttgart, 427-428.*

- Döcke, F., Hoedemaker, M. (2000):  
Pheromone. In: Wiesner, E., Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin. 4. Aufl., Enke, Stuttgart, 1120.
- Doering, D. D., Steckelbroeck, S., Doering, T., Klingmüller, D. (2002):  
Effects of butyltins on human 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 activity. *Steroids* 67, 859-867.
- Dorfman, R. I., deNikola, A., Gottfried, H., Forchielli, E. (1968):  
Testosterone and Epitestosterone in Human Urine. In: Tamm, J. (Hrsg.): Testosterone; Proceedings of the Workshop Conference held from April 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup>, 1967 at Tremsbüttel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 216-219.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J. (2003):  
Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquat Toxicol* 64, 437-449.
- Durhan, E. J., Lambright, C. S., Makynen, E. A., Lazorchak, J., Hartig, P. C., Wilson, V. S., Gray, L. E. Jr., Ankley, G.T. (2006):  
Identification of Metabolites of Trenbolone Acetate in Androgenic Runoff from a Beef Feedlot. *Environ Health Perspect* 114 (1), 65-68.
- Durhan, E. J., Lambright, C. S., Wilson, V., Butterworth, B. C., Kuehl, D. W., Orlando, E.F., Guillette, L. J., Gray, L. E. Jr., Ankley, G.T. (2002):  
Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a pulp and paper mill effluent. *Environ Toxicol Chem* 21 (9), 1973-1976.
- Duursma, E. K., Carroll, J. L. (1996):  
Environmental compartments. Equilibria and Assessment of Processes Between Air, Water, Sediments and Biota. Springer, Berlin.
- Facemire, C. F., Gross, T. S., Guillette, L. J. Jr. (1995):  
Reproductive Impairment in the Florida Panther: Nature or Nurture? *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 4), 79-86.
- Falck, F., Ricci, A., Wolff, M. S., Godbold, J., Deckers, P. (1992):  
Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47 (2), 143-146.
- Fehrenbach, H., Knappe, F. (2002):  
Ökobilanzielle Betrachtung von Entsorgungsoptionen für Klärschlamm im Land Schleswig-Holstein; im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten (MUNF) des Landes Schleswig-Holstein. [www.umwelt.schleswig-holstein.de/servlet/is/23013/Klaerschlamm.pdf](http://www.umwelt.schleswig-holstein.de/servlet/is/23013/Klaerschlamm.pdf)
- Fent, K. (1996):  
Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol* 26, 1-117.
- Finlay-Moore, O., Hartel, P. G., Cabrera, M. L. (2000):  
17 $\beta$ -Estradiol and Testosterone in Soil and Runoff from Grasslands Amended with Broiler Litter. *J Environ Qual* 29, 1604-1611.

- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Kroll, K., Orlando, E. F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Guillette, L. J. Jr. (2001) :  
Altered Serum Sex Steroids and Vitellogenin Induction in Walleye (*Stizostedion vitreum*) Collected Near a Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Arch Environ Contam Toxicol* 40 (3), 392-398.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette L. J. Jr. (1996):  
Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104 (10), 1096–1101.
- Fry, D. M. (1995):  
Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7), 165-171.
- Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N., Morita, N. (2002):  
Degradation of 17 $\beta$ -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Appl Environ Microbiol* 68, 2057-2060.
- Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T., Kikuchi, S. (2003):  
*Novosphingobium tardaogens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Environ Microbiol* 53, 47-52.
- Furuichi, T., Kannan, K., Giesy, J. P., Masunaga, S. (2004):  
Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. *Water Research* 38 (20), 4491-4501.
- Gärtner, R., Haen, E. (2001):  
Sexualhormone. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München • Jena, 687-704.
- GDCh -Gesellschaft Deutscher Chemiker- (2000):  
Genistein - Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen. BUA-Stoffbericht 222, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft S. Hirzel, Stuttgart.
- Gercken, J., Sordyl, H. (2002):  
Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Mar Environ Res* 54, 651-655.
- Giese, C. (2004):  
Untersuchungen zur Biodegradation von Östrogenen im aquatischen Milieu. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2004.
- Giese, C., Miethe, N., Schlenker, G. (2007):  
Biologischer Abbau von Östrogenen im Flusswasser. *BMTW* 120 (3-4), 141-147.

- Gong, Y., Chin, H. S., Lim, L. S. E., Loy, C. J., Obbard, J. P., Yong, E. L. (2003):  
Clustering of Sex Hormone Disruptors in Singapore's Marine Environment. *Environ Health Perspect* 111 (12), 1448-1453.
- Gooding, M. P., Wilson, V. S., Folmar, L. C., Marcovich, D. T., LeBlanc, G. A. (2003):  
The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environ Health Perspect* 111 (4), 426-430.
- Gülden, M., Turan, A., Seibert, H. (1997):  
Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltbundesamt Berlin, Texte 46/97.
- Guillette, L. J. Jr., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R. (1994):  
Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102 (8), 680-688.
- Hakk, H., Millner, P., Larsen, G. (2005):  
Decrease in water-soluble 17beta-Estradiol and testosterone in composted poultry manure with time. *J Environ Qual* 34 (3), 943-50.
- Hassanin, A., Kuwahara, S., Nurhidayat, Tsukamoto, Y., Ogawa, K., Hiramatsu, K., Sasaki, F. (2002):  
Gonadosomatic Index and Testis Morphology of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Rivers Contaminated with Estrogenic Chemicals. *J Vet Med Sci* 64 (10), 921-926.
- Hecker, M., Tyler, C. R., Hoffmann, M., Maddix, S., Karbe, L. (2002):  
Plasma Biomarkers in Fish Provide Evidence for Endocrine Modulation in the Elbe River, Germany. *Environ Sci Technol* 36 (11), 2311-2321.
- Heidrich, D. D., Steckelbroeck, S., Klingmüller, D. (2001):  
Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66, 763-769.
- Hewitt, L. M., Parrott, J. L., McMaster, M. E. (2006):  
A Decade of Research on the Environmental Impacts of Pulp and Paper Mill Effluents in Canada: Sources and Characteristics of Bioactive Substances. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9(4), 341-356.
- Hill, E. M., Evans, K. L., Horwood, J., Rostkowski, P., Oladapo, F. O., Gibson, R., Shears, J. A., Tyler, C. R. (2010):  
Profiles and Some Initial Identifications of (Anti)Androgenic Compounds in Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluents. *Environ Sci Technol* 44, 1137-1143.
- Hirsch, K. S., Weaver, D. E., Black, L. J., Falcone, J. F., MacLusky, N. J. (1987):  
Inhibition of central nervous system aromatase activity: A mechanism for fenarimol-induced infertility in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 91, 235-245.
- Holbrook, R. D., Novak, J. T., Grizzard, T. J., Love, N. G. (2002):  
Estrogen Receptor Agonist Fate during Wastewater and Biosolids Treatment Processes: A Mass Balance Analysis. *Environ Sci Technol* 36 (21), 4533-4539.

- Hori, S. H., Kodama, T., Tanahashi, K. (1979):  
Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen Comp Endocrinol* 37 (3), 306-20.
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Morita, M. (1997):  
Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environ Pollut* 95, 85-91.
- Horinouchi, M., Hayashi, T., Yamamoto, T., Kudo, T. (2003):  
A New Bacterial Steroid Degradation Gene Cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 Which Consists of Aromatic-Compound Degradation Genes for Seco-Steroids and 3-Ketosteroid Dehydrogenase Genes. *Appl Environ Microbiol* 69 (8), 4421-4430.
- Horinouchi, M., Kurita, T., Yamamoto, T., Hatori, E., Hayashi, T. & Kudo, T. (2004):  
Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from *meta*-cleavage enzyme gene *tesB* to regular gene *tesR*. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 597-604.
- Hornung, M. W., Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Durhan, E. J., Denny, J. S., Henry, T. R., Ankley, G. T. (2004):  
Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone: conversion of 17 $\alpha$ -methyltestosterone to 17 $\alpha$ -methylestradiol. *Aquat Toxicol* 66, 15-23.
- Horton, R. (1979):  
Testicular Steroid Secretions, Transport, and Metabolism. In: DeGroot, L.J., Cahill, G.F.Jr., Martini, L., Nelson, D.H., Odell, W.D., Potts, J.T.Jr., Steinberger, E., Winegrad, A.I. (Hrsg.): *Endocrinology*, Volume 3, Grune & Stratton, New York, 1521-1525.
- Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G., Gray, L. E. Jr. (2002):  
Androgens and Environmental Antiandrogens Affect Reproductive Development and Play Behavior in the Sprague-Dawley Rat. *Environ Health Perspect* 110 (Suppl 3), 435-439.
- Howell, W. M., Black, D. A., Bortone, S. A. (1980):  
Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia* 4, 676-681.
- Howell, W. M., Denton, T. E. (1989):  
Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environ Biol Fishes* 24 (1), 43-51.
- Ismail, A. A. A., Harkness, R. A., Loraine, J. A. (1968):  
Observations on Urinary Testosterone Excretion during the Menstrual Cycle and in Pregnancy. In: Tamm, J. (Hrsg.): *Testosterone*; Proceedings of the Workshop Conference held from April 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup>, 1967 at Tremsbüttel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 211-215.

- Jacobsen, A.-M., Lorenzen, A., Chapman, R., Topp, E. (2005):  
Persistence of Testosterone and 17 $\beta$ -Estradiol in Soils Receiving Swine Manure or Municipal Biosolids. *J Environ Qual* 34, 861-871.
- Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C. (2006):  
Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71, 435-444.
- Jegou, B., Sots, A., Sundlof, S., Stephany, R., Meyer, H., Leffers, H. (2001):  
Existing guidelines for the use of meat hormones and other food additives in Europe and USA. *APMIS (Suppl.)* 103, S551-S556.
- Jenkins, M. B., Endale, D. M., Schomberg, H. H., Sharpe, R. R. (2006):  
Fecal bacteria and sex hormones in soil and runoff from cropped watersheds amended with poultry litter. *Sci Total Environ* 358 (1-3), 164-77.
- Jenkins, R. L., Angus, R. A., McNatt, H., Howell, W. M., Kemppainen, J. A., Kirk, M., Wilson, E. M. (2001):  
Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ Toxicol Chem* 20 (6), 1325-1331.
- Jenkins, R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., Kirk, M. (2003):  
Androstenedione and Progesterone in the Sediment of a River Receiving Paper Mill Effluent. *Toxicol Sci* 73, 53-59.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., Tyler, C. R. (2004):  
Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 66, 207-222.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C. R., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G. (2006):  
Predicted Exposures of Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environ Health Perspect* 114 (Suppl. 1), 32-39.
- Johnson, A. C., Williams, R. J., Matthiessen, P. (2006):  
The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci Total Environ* 362, 166-178.
- Jones, M.-A., Stauber, J., Apte, S., Simpson, S., Vicente-Beckett, V., Johnson, R., Duivenvoorden, L. (2005):  
A risk assessment approach to contaminants in Port Curtis, Queensland, Australia *Mar Pollut Bull* 51, 448-458.
- Jürgens, M. D., Holthaus, K. I., Johnson, A. C., Smith, J. L., Hetheridge, M., Williams, R. J. (2002):  
The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem* 21(3), 480-488.
- Kajiwara, N., Kunisue, T., Kamikawa, S., Ochi, Y., Yano, S., Tanabe S. (2006):  
Organohalogen and organotin compounds in killer whales mass-stranded in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. *Mar Pollut Bull* 52, 1066-1076.



- Katsiadaki, I., Scott, A. P., Hurst, M. R., Matthiessen, P., Mayer, I. (2002):  
 Detection of Environmental Androgens: A novel Method based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Spiggin, the Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem* 21 (9), 1946-1954.
- Kavanagh, R. J., Balch, G. C., Kiparissis, Y., Niimi, A. J., Sherry, J., Tinson, C., Metcalfe, C. D. (2004):  
 Endocrine Disruption and Altered Gonadal Development in White Perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. *Environ Health Perspect* 112 (8), 898-902.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Earl Gray, L., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., Tilson, H. A. (1996):  
 Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 (4), 715-740.
- Kirk, L. A., Tyler, C. R., Lye, C. M., Sumpter, J. P. (2002):  
 Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ Toxicol Chem* 21 (5), 972-979.
- Knopp, A., Knopp, D., Niessner, R. (1999):  
 ELISA determination of the sulfonylurea herbicide Metsulfuron-Methyl in different water types. *Environ Sci Technol* 33 (2), 358-361.
- Knorr, D. (1968):  
 Normal Values for Urinary Testosterone in Boys and Adolescents. In: Tamm, J. (Hrsg.): Testosterone; Proceedings of the Workshop Conference held from April 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup>, 1967 at Tremsbüttel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 188-189.
- Körner, W., Vinggaard, A., Terouanne, B., Ma, R., Wieloch, C., Schlumpf, M., Sultan, C., Soto, A. (2004):  
 Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 112, 695-702.
- Kolodziej, E. P., Gray, J. L., Sedlak, D. L. (2003):  
 Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem* 22 (11), 2622-2629.
- Kolodziej, E. P., Harter, T., Sedlak, D. L. (2004):  
 Dairy Wastewater, Aquaculture, and Spawning Fish as Sources of Steroid Hormones in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol* 38, 6377-6384.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002):  
 Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999 – 2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36 (6), 1202-1211.

- Kroker, R. (2006):  
Hormone und hormonell wirksame Pharmaka. In: Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R. (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 7. Aufl., Parey, Berlin, 351-363.
- Krüskenper, H. L. (1965):  
Anabole Steroide. 2. Aufl., Georg-Thieme, Stuttgart.
- Labadie, P., Budzinski, H. (2005):  
Determination of Steroidal Hormone Profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ Sci Technol* 39 (14), 5113-5120.
- Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. (2000):  
Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol* 34 (18), 3890-3894.
- Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. (2002):  
Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* 68 (2), 859-864.
- Lange, I. G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., Meyer, H.H.D. (2002):  
Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal Chim Acta* 473, 27-37.
- Larsson, D. G. J., Hällman, H., Förlin, L. (2000):  
More male fish embryos near a pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 19 (12), 2911-2917.
- Lavado, R., Barbaglio, A., Candia Carnevali, M. D., Porte, C. (2006):  
Steroid levels in crinoid echinoderms are altered by exposure to model endocrine disruptors. *Steroids* 71, 489-497.
- Lee, L. S., Strock, T. J., Sarmah, A. K., Rao, P. S. C. (2003):  
Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soils and Sediment. *Environ Sci Technol* 37 (18), 4098-4105.
- Le Guevel, R., Pakdel, F. (2001):  
Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. *Human Reprod* 16 (6), 1030-1036.
- Leppik, R. A. (1989):  
Steroid catechol degradation: Disecoandrostane intermediates accumulate by *Pseudomonas* transposon mutant strains. *J Gen Microbiol* 135, 1979-1988.
- Leppik, R. A., Sinden, D. J. (1987):  
*Pseudomonas* mutant strains that accumulate androstane and seco-androstane intermediates from bile acids. *Biochem J* 243, 15-21.
- Leung, K. M. Y., Dewhurst, R. E., Halldórsson, H., Svavarsson, J. (2005):  
Metallothioneins and trace metals in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) collected from Icelandic coasts. *Mar Pollut Bull* 51, 729-737.

- Leusch, F. D. L., Chapman, H. F., Kay, G. W., Gooneratne, S. R., Tremblay, L. A. (2006a):  
Anal Fin Morphology and Gonadal Histopathology in Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) Exposed to treated Municipal Sewage Effluent. Arch Environ Contam Toxicol 50 (4), 562-574.
- Leusch, F. D. L., Chapman, H. F., van den Heuvel, M. R., Tan, B. L. L., Gooneratne, S. R., Tremblay, L. A. (2006b):  
Bioassayed-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. Ecotoxicol Environ Safety 65 (3), 403-411.
- Leusch, F. D. L., van den Heuvel, M. R., Chapman, H. F., Gooneratne, S. R., Eriksson, A. M. E., Tremblay, L. A. (2006c):  
Development of methods for extraction and in vitro quantification of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. Comparative Biochemistry and Physiology C 143, 117-126.
- Lindemann, K. (2005):  
Untersuchungen zum biologischen Abbau von Progesteron im Oberflächenwasser. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2005.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A. (2003):  
Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem 75 (5), 631-681.
- Liu, B., Liu, X. (2004):  
Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. Sci Total Environ 320 (2-3), 269-274.
- Lorenzen, A., Chapman, R., Hendel, J. G., Topp, E. (2005):  
Persistence and Pathways of Testosterone Dissipation in Agricultural Soil. J Environ Qual 34, 854-860.
- Lorenzen, A., Hendel, J. G., Conn, K. L., Bittman, S., Kwabiah, A. B., Lazarovitz, G., Massé, D., McAllister, T. A., Topp, E. (2004):  
Survey of Hormone Activities in Municipal Biosolids and Animal Manures. Environ Toxicol 19 (3), 216-225.
- MacDonald, I. A., Jellet, J. F., Mahony, D. E., Holdeman, L. V. (1979):  
Bile salt 3 $\alpha$ - and 12 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium lentum* and related organisms. Appl Environ Microbiol 37, 992-1000.
- MacDonald, I. A., Meier, E. C., Mahony, D. E., Costain, G. A. (1976):  
3 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ - and 12 $\alpha$ - hydroxysteroid dehydrogenases activities from *Clostridium perfringens*. Biochim Biophys Acta 450, 142-153.
- Mallonee, D. H., Lijewski, M. A., Hylemon, P. B. (1995):  
Expression in *Escherichia coli* and characterization of a bile acid-inducible 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. Curr Microbiol 30, 259-263.
- Marcus, P. I., Talalay, P. (1956):  
Induction and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. J Biol Chem 218, 661-674.

- Marshall, D. J., Rajkumar, A. (2003):  
Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. *Mar Pollut Bull* 46, 1150-1155.
- Martin, C. R. (1985):  
Endocrine Physiology. Oxford University Press, New York-Oxford.
- Matthiessen, P., Allen, Y., Bamber, S., Craft, J., Hurst, M., Hutchinson, T., Feist, S., Katsiadaki, I., Kirby, M., Robinson, C., Scott, S., Thain, J., Thomas, K. (2002):  
The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom—summary of the EDMAR programme. *Mar Environ Res* 54, 645–649.
- McMaster, M. E., Van Der Kraak, G. J., Munkittrick, K. R. (1995):  
Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp Biochem Physiol C* 112, 169-178.
- McMaster, M. E., Van Der Kraak, G. J., Portt, C. B., Munkittrick, K. R., Sibley, P. K., Smith, I. R., Dixon, D. G. (1991):  
Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 21, 199-218.
- Meyer, H. H. D. (1994):  
Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen. In: Döcke, F. (Hrsg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, 76-91.
- Miethe, N., Schlenker, G., Lindemann, K. (2004):  
Kalibration und nichtlineare Regression zur Beschreibung von Verlaufskurven des Progesteronabbaus. In: Liesebach, M., Semmler-Busch, U. (Hrsg.): *Tagungsberichte der Arbeitsgruppe Ökologie und Umwelt*, 17. Herbstkolloquium, 4. und 5. Oktober 2004, Oldenburg
- Möhle, U., Heistermann, M., Palme, R., Hodges, J. K. (2002):  
Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. *Gen Comp Endocrinol* 129 (3), 135-145.
- Moore, A., Scott, A. P. (1991):  
Testosterone is a potent odorant in precocious male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Phil Trans Roy Soc Lond B* 332, 241–244.
- Mori, T., Matsumoto, H., Yokota, H. (1998):  
Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67 (2), 133-41.
- Morthorst, J. E., Holbech, H., Bjerregaard, P. (2010):  
Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* 98 (4), 336-343.
- Müller, W., Schlenker, G. (2003):  
Kompendium der Tierhygiene. Gesundheits-, Tier-, Umwelt- und Verbraucherschutz. 1. Auflage, Lehmanns Media, Berlin.

- Munkittrick, K. R., Servos, M. R., Carey, J. H., Van Der Kraak, G. J. (1997):  
Environmental impact of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction at North American pulp mills since 1992. *Water Sci Technol* 35 (2-3), 329-338.
- Munkittrick, K. R., Van Der Kraak, G. J., McMaster, M. E., Portt, C. B., Van den Heuvel, M. R., Servos, M. R. (1994):  
Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environ Toxicol Chem* 13, 1089-1101.
- Murai, R., Takahashi, S., Tanabe, S., Takeuchi, I. (2005):  
Status of butyltin pollution along the coasts of western Japan in 2001, 11 years after partial restrictions on the usage of tributyltin. *Mar Pollut Bull* 51, 940-949.
- Nagasawa, M., Bae, M., Tamura, G., Arima, K. (1969):  
Microbial transformation of sterols: Part II. Cleavage of sterol side chains by microorganisms. *Agric Biol Chem* 33, 1644-1650.
- Navratil, S., Matoušková, O. (1978):  
Androgen excretion in pigs. *Vet Med Praha* 23, 77-86.
- Negri, A. P., Hales, L. T., Battershill, C., Wolff, C., Webster, N. S. (2004):  
TBT contamination identified in Antarctic marine sediments. *Mar Pollut Bull* 48, 1142-1144.
- Neher, R. (1968):  
Biosynthese des Testosteron. In: Klein, E. (Hrsg.): *Das Testosteron • Die Struma, Dreizehntes Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Würzburg vom 2.-4. März 1967*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1-15.
- Nikov, K., Smolka, S. (2003):  
Vorstudie im Kontext Chemikalieneinsatz in der Aquakultur. Pestizid Aktions-Netzwerk e.V. (PAN Germany), Hamburg. [http://www.pan-germany.org/download/aquakultur\\_1.pdf](http://www.pan-germany.org/download/aquakultur_1.pdf)
- Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1997):  
Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 147 (2), 381-90.
- OECD (1993):  
Guidelines for the testing of chemicals. Section 3 – Degradation and accumulation, 301 A, 303 A.
- OECD (2001):  
Guideline for the testing of chemicals. Revised proposal for a new guideline: 309.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U. (2003):  
Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl Chem* 75, 2207-2218.
- Ohno, S., Nakajima, Y., Nakajin, S. (2005):  
Triphenyltin and Tributyltin inhibit pig testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and suppress testicular testosterone biosynthesis. *Steroids* 70, 645-651.

- Olivereau, M., Olivereau, J. (1985):  
Effect of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the skin and gonads of freshwater male silver eels. *Gen Comp Endocrinol* 57, 64-71.
- Oppermann, U.C.T., Maser, E. (1996):  
Characterization of a 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase / carbonyl reductase from the Gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur J Biochem* 241, 744-749.
- Orlando, E. F., Kolok, A. S., Binzcik, G. A., Gates, J. L., Horton, M. K., Lambright, C. S., Gray, E. L. Jr., Soto, A. M., Guillette, L. J. Jr. (2004):  
Endocrine-Disrupting Effects of Cattle Feedlot Effluent on an Aquatic Sentinel Species, the Fathead Minnow. *Environ Health Perspect* 112 (3), 353-358.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M. N. (1996):  
Excretion of infused 14C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci* 43, 43-63.
- Parks, L. G., Lambright, C. S., Orlando, E. F., Guillette, L. J., Ankley, G. T., Gray, L. E. (2001):  
Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent - contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicol Sci* 62 (2), 257-267.
- Pauli, W., Jax, K., Berger, S. (2001):  
Protozoa in wastewater treatment: funktion and importance. In: Beek, B (Hrsg.): *Biodegradation and persistence*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 203-253.
- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J. A., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2004a):  
Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicol* 68, 277-291.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2004b):  
Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol Environ Safety* 57, 330-345.
- Peterson, E. W., Davis, R. K., Orndorff, H. A. (2000):  
17 $\beta$ -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifer. *J Environ Qual* 29, 826-834.
- Purdom, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., Sumpter, J. P. (1994):  
Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8, 275-285.
- Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A. (2002):  
Combining Xenoestrogens at Levels below Individual No-Observed-Effect Concentrations Dramatically Enhances Steroid Hormone Action. *Environ Health Perspect* 110 (9), 917-921.
- Reijnders, P. J. H. (1986):  
Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324, 456 – 457.

- Reinecke, W. (2001):  
Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of mikroorganismen. In: Beek, B (Hrsg.): Biodegradation and persistence. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1-163.
- Richtlinie 96/22/EG
- Roos, A., Greyerz, E., Olsson, M., Sandegren, F. (2001):  
The otter (*Lutra lutra*) in Sweden — population trends in relation to  $\Sigma$ DDT and total PCB concentrations during 1968–99. *Environ Pollut* 111, 457–469.
- Safe, S., Krishnan, V. (1995):  
Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. *Toxicol Lett* 82-83, 731-736.
- Sangsupan, H. A., Radcliffe, D. E., Hartel, P. G., Jenkins, M. B., Vencill, W. K., Cabrera, M. L. (2006):  
Sorption and Transport of  $17\beta$ -Estradiol and Testosterone in Undisturbed Soil Columns. *J Environ Qual* 35, 2261-2272.
- Schiffer, B., Daxenberger, A., Meyer, K., Meyer, H. H. D. (2001):  
The Fate of Trenbolone Acetate and Melengestrol Acetate after Application as Growth Promoters in Cattle: Environmental Studies. *Environ Health Perspect* 109 (11), 1145-1151.
- Schlenker, G., Birkelbach, C., Glatzel, P. S. (1999 a):  
Verlaufsuntersuchungen zum Temperatureinfluss auf die Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von Kühen. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 112, 459-464.
- Schlenker, G., Müller, W., Birkelbach, C., Glatzel, P. S. (1999 b):  
Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* auf das Steroid Östron. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 112, 14-17.
- Schmid, E., Frühauf, P. (1998):  
Instrumentelle Methoden zur Bestimmung von Steroiden im Wasser. *Wiener Mitteilungen* 153, 17-32.
- Scholz, S., Mayer, I. (2008):  
Molecular biomarkers of endocrine disruption in smallmodel fish. *Mol Cell Endocrinol* 293 (1-2), 57-70.
- Schopper, D., Hoffmann, B. (1981):  
Identifizierung von  $17\alpha$ -Trenbolon als Hauptausscheidungsprodukt des Trenbolonacetat-Stoffwechsels beim Kalb und sich daraus ergebende Konsequenzen für die Rückstandsanalytik. *Arch Lebensmittelhyg* 32, 141-144.
- Schulte-Oehlmann, U., Bachmann, J., Candia Carnevali, D., Janer, G., Jobling, S., Kloas, W., Kusk, O., Lavado, R., Lutz, I., Porte, C., Sugni, M., Watermann, B., Wollenberger, L., Oehlmann, J. (2005):  
Quae nocent, docent: Vergleichende Untersuchung zur Wirkung endokriner Disruptoren im Tierreich. In: Wenzel, A., Rappolder, M., Werschkuhn, B. (Hrsg.): 3. Statusseminar Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System. Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung und Regulierung, Berlin, 2. Juni 2005. Stuttgart, Fraunhofer IRB Verlag, 64-73.

- Schulte-Oehlmann, U., Bettin, C., Fioroni, P., Oehlmann, J., Stroben, E. (1995):  
*Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology* 4, 372-384.
- Schubert, K., Böhme, K. H., Ritter, F., Hörhold, C. (1968):  
 Mikrobieller Abbau von Progesteron zu  $\alpha$ -Ketoglutar säure und Bernsteinsäure. *Biochim. Biophys Acta* 152, 401-408.
- Schubert, K., Ritter, F., Sorkina, T., Böhme, K.-H., Hörhold, C. (1969):  
 Abbau von Steroiden – VIII. Bildung von [1,4-<sup>14</sup>C] Bernsteinsäure aus [1,3 $\alpha$ -<sup>14</sup>C] 7 $\alpha$ -methyl-5,6,7,7 $\alpha$ -tetrahydroindan-1,5-dion-4-(3-propionsäure) durch *Nocardia opaca*. *J Steroid Biochem* 1, 1-7.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., Bamberg, E. (1996):  
 Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim Reprod Sci* 42, 515-526.
- Scott, A. P., Katsiadaki, I., Kirby, M. F., Thain, J. (2006):  
 Relationship between Sex Steroid and Vitellogenin Concentrations in Flounder (*Platichthys flesus*) Sampled from an Estuary Contaminated with Estrogenic Endocrine-Disrupting Compounds. *Environ Health Perspect* 114 (Suppl. 1), 27-31.
- Shahidi, N. T. (2001):  
 A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics* 23 (9), 1355-1390.
- Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E. (1993):  
 Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341, 1392-1395.
- Shim, W. J., Hong, S. H., Kim, N. S., Yim, U. H., Li, D., Oh, J. R. (2005):  
 Assessment of butyl- and phenyltin pollution in the coastal environment of Korea using mussels and oysters. *Mar Pollut Bull* 51, 922-931.
- Shore, L. S., Correll, D. L., Chakraborty, P. K. (1995):  
 Relationship of fertilization with chicken manure and concentrations of estrogens in small streams. In: Steele, K. (Hrsg.): *Animal waste and land-water interface*. CRC Press, Boca Raton, FL., 155-162.
- Shore, L. S., Gurevitz, M., Shemesh, M. (1993a):  
 Estrogen as an Environmental Pollutant. *Bull Environ Contam Toxicol* 51, 361-366.
- Shore, L. S., Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shemesh, M. (1993b):  
 Factors affecting the concentration of testosterone in poultry litter. *J Environ Sci Health, Part A* 28, 1737-1749.
- Shore, L. S., Kapulnik, Y., Ben-Dor, B., Fridman, Y., Wininger, S., Shemesh, M. (1992):  
 Effects of estrone and 17  $\beta$ -estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*. *Physiol Plant* 84 (2), 217-222.
- Shore, L. S., Reichmann, O., Shemesh, M., Wenzel, A., Litaor, M.I. (2004):  
 Washout of accumulated testosterone in a watershed. *Sci Total Environ* 332, 193-202.



- Siiteri, P. K., Febres, F. (1979):  
Ovarian Hormone Synthesis, Circulation, and Mechanisms of Action. In: DeGroot, L. J., Cahill, G. F. Jr., Martini, L., Nelson, D. H., Odell, W. D., Potts, J. T. Jr., Steinberger, E., Winegrad, A. I. (Hrsg.): Endocrinology, Volume 3. Grune & Stratton, New York San Francisco London, 1401–1417.
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A. (2002):  
Something from “nothing” - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOEC’s produce significant mixture effects. Environ Sci Technol 36, 1751–1756.
- Sohoni, P., Sumpter, J. P. (1998):  
Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol 158, 327-339.
- Sorensen, P. W., Stacey, N. E. (1999):  
Evolution and Specialization of Fish Hormonal Pheromones. In: Johnston, R. E., Müller-Schwarze, D., Sorensen, P. W. (Hrsg.): Advances in Chemical Signals in Vertebrates. 1. Aufl., Kluwer Academic/Plenum, New York, NY, USA, 15-47.
- Soto, A. M., Calabro, J. M., Prechtel, N. V., Yau, A. Y., Orlando, E. F., Daxenberger, A., Kolok, A. S., Guillette, L. J. Jr., Bizac, B. le, Lange, I. G., Sonnenschein, C. (2004):  
Androgenic and Estrogenic Activity in Water Bodies Receiving Cattle Feedlot Effluent in Eastern Nebraska, USA. Environ Health Perspect 112 (3), 346-352.
- Spooner, N., Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Goad, L. J. (1991):  
The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Marine Environmental Research 32, 37-49.
- Staib, W. (1968):  
Der intracelluläre Testosteronstoffwechsel. Quantitative Bestimmung von Testosteron im Harn. In: Klein, E. (Hrsg.): Das Testosteron • Die Struma, Dreizehntes Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Würzburg vom 2.-4. März 1967. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 32-50.
- Stumpe, B., Marschner, B. (2007):  
Long-term sewage sludge application and wastewater irrigation on the mineralization and sorption of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in soils. Sci Total Environ 374, 282-291.
- Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., Kruse, R. L., Calafat, A. M., Mao, C. S., Redmon, J. B., Ternand, C. L., Sullivan, S., Teague, J. L. and the Study for Future Families Research Team (2005):  
Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environ Health Perspect 113 (8), 1056–1061.
- Swannell, R. P. J., Rose, C. L., Williams, R. J., Johnson, A. C., Besien, T. J., Leeks, G. J. L. (1995):  
Test guidelines of the biodegradability of pesticides in natural sediment/water systems: A review. Final report to the department of the environment, contact No. EPG 1/5/47, London, U. K.

- Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A. M., Luizzi, M. F., Sonnenschein, C. (1997):  
Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138, 1406–1412.
- Tabak, H. H., Bloomhuff, R. N., Bunch, R. L. (1981):  
Steroid Hormones as Water Pollutants II. Studies on the Persistence and Stability of Natural Urinary and Synthetic Ovulation-Inhibiting Hormones in Untreated and Treated Wastewaters. *Dev Ind Microbiol* 22, 497-519.
- Talalay, P., Dobson, M. M., Tapley, D. F. (1952):  
Oxidative degradation of testosterone by adaptive enzymes. *Nature* 170, 620-621.
- Thomas, K. V., Hurst, M. R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldock, M. J. (2002):  
An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ Toxicol Chem* 21 (7), 1456-1461.
- Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J. Jr., Legou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Mueller, J., Raipert-De Meyts, E., Scheik, T., Shape, R., Sumpster, J., Skakkebaek, N. E. (1996):  
Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 4), 741-803.
- Träger, L. (1977):  
Steroidhormone, Springer Verlag, Berlin.
- Tully, D. B., Cox, V. T., Mumtaz, M. M., Davis, V. L., Chapin, R. E. (2000):  
Six high-priority organochlorine pesticides, either singly or in combination, are nonestrogenic in transfected HeLa cells. *Reprod Toxicol* 14, 95-102.
- Turner, C. L. (1941):  
Morphogenesis of the gonopodium in *Gambusia affinis affinis*. *J Morphol* 69, 161-185.
- Turner, C. L. (1960):  
The Effects of Steroid Hormones on the Development of Some Secondary Sexual Characters in Cyprinodont Fishes. *Trans Am Microsc Soc* 79, 320-333.
- Uwajima, T., Takayama, K., Terada, O. (1978):  
Production, purification and crystallization of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Agric Biol* 42, 1577-1583.
- van der Kraak, G. J., Munkittrick, K. R., McMaster, M. E., Portt, C. B., Chang, J.P. (1992):  
Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol Appl Pharmacol* 115, 224-233.
- van der Merwe, P. J., Pieterse, J. W. (1994):  
Stability of Zeranol, Nandrolone and Trenbolone in Bovine Urine. *Analyst* 119, 2651-2653.

- Velle, W. (1976):  
Endogenous anabolic agents in farm animals. In: Lu, F. C., Rendel, J. (Hrsg.): Anabolic Agents in Animal Production, FAO/WHO Symposium, Rom 1975. Georg Thieme, Stuttgart.
- Vermeulen, A. (1968):  
Testosterone Excretion, Plasma Testosterone Levels and Testosterone Production Rates in Health and Disease. In: Tamm, J. (Hrsg.): Testosterone; Proceedings of the Workshop Conference held from April 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup>, 1967 at Tremsbüttel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 170-175.
- Vogt, K. (1984):  
Radioimmunologische Bestimmung von Trenbolon in Urin, Galle und Kot von Maskälbern nach subcutaner Implantation von Revalor. Arch Lebensmittelhyg 35, 27-32.
- Voss, H. E., Oertel, G. (1973):  
Androgene I. Handbuch experimenteller Pharmakologie XXXV/1. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Vulliet, E., Falletta, M., Marote, P., Lomberget, T., Païssé, J.-O., Grenier-Loustalot, M.-F. (2010):  
Light induced degradation of testosterone in waters. Sci Total Environ 408 (17), 3554–3559.
- Wegener, G., Persin, J., Karrenbrock, F., Rörden, O., Hübner, I. (1999):  
Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugate in der aquatischen Umwelt. Vom Wasser 92, 347-360.
- Weybridge Conference (1996):  
European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings, 2-4 December 1996, Weybridge, UK.
- Wiig, Ø., Derocher, A. E., Cronin, M. M., Skaare, J. U. (1998):  
Female pseudohermaphrodite polar bears at svalbard. J Wildl Dis 34 (4), 792-796.
- Williams-Ashman, H. G. (1975):  
Metabolic effects of testicular androgens. In: Hamilton, D.W., Greep, R.O. (Hrsg.): Male Reproductive System. Handbook of Physiology, Sect. 7, Vol. V. Amer. Physiol. Soc., Washington, D.C., 473-490.
- Williams-Ashman, H. G. (1979):  
Biochemical Features of Androgen Physiology. In: DeGroot, L.J., Cahill, G.F.Jr., Martini, L., Nelson, D.H., Odell, W.D., Potts, J.T.Jr., Steinberger, E., Winegrad, A.I. (Hrsg.): Endocrinology, Volume 3, Grune & Stratton, New York, 1527-1533.
- Williams, R. J., Johnson, A. C., Smith, J. J. L., Kanda, R. (2003):  
Steroid Estrogens Profiles along River Stretches Arising from Sewage Treatment Works Discharges. Environ Sci Technol, 37 (9), 1744 –1750.
- Wilson, V. S., Lambright, C., Ostby, J., Gray, L. E. Jr. (2002):  
*In Vitro* and *in Vivo* Effects of 17 $\beta$ -Trenbolone: A Feedlot Effluent Contaminant. Toxicol Sci 70, 202-211.

- Wingfield, J. C., Marler, P. (1988):  
Endocrine basis of communication in reproduction and aggression. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Hrsg.): The Physiology of Reproduction, Vol. 2. Raven Press, New York, 1647-1677.
- Wolf, C. J., Hotchkiss, A., Ostby, J. S., LeBlanc, G. A., Gray, L. E. Jr. (2002):  
Effects of Prenatal Testosterone Propionate on the Sexual Development of Male and Female Rats: A Dose-Response Study. *Toxicol Sci* 65, 71-86.
- Wollrab, J., Ittrich, G. (1974):  
Untersuchungen zur Testosteronausscheidung beim männlichen Rind. *Monatsh Veterinärmed* 29, 454-459.
- Ying, G.-G., Kookana, R. S., Ru, Y.-J. (2002):  
Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int* 28 (6), 545-551.
- Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H., Omura, H. (2004):  
Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 70, 5283-5289.
- Zerulla, M. (2001):  
Etablierung einer *in vivo* Kurzzeitprüfung von endokrin wirksamen Substanzen an juvenilen Fischen. Dissertation, Universität Konstanz, 2001.
- Zhang, Y., Zhou, J. L., Ning, B. (2007):  
Photodegradation of estrone and 17beta-estradiol in water. *Water Res* 41(1), 19-26.
- Zuo, Y., Zhang, K., Deng, Y. (2006):  
Occurrence and photochemical degradation of 17alpha-ethinylestradiol in Aoushnet River Estuary. *Chemosphere* 63 (9), 1583-1590.

## 9 Anhang

### 9.1 Verlauf der Konzentration von Testosteron im Flusswasser

**Tabelle 9.1: Übersicht über das verwendete Wasser für die Versuchsreihen FW I-VII zum Verlauf der Testosteronkonzentration in Flusswasser**

Tag der Wasserentnahme	Temperatur / pH-Wert des Wassers	Versuchsreihe FW						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
22.03.04	13,1 C / 8,69	x						
05.04.04	12,5 C / 8,44		x					
19.04.04	16,7 C / 8,38			x	x			
30.08.04	19,8 C / 8,22					x	x	
06.09.04	21,7 C / 8,17							x

**Tabelle 9.2: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE/ml) in den Versuchsreihen FW I-VII zum Verlauf der Testosteronkonzentration in Flusswasser über den Versuchszeitraum von 6 bzw. 28 Tagen und einer Lagerung bei 5 bzw. 20 °C auf Standard I – Agarplatten**

Versuchsreihe FW	Lagerungstemperatur	koloniebildende Einheiten (KbE/ml) am Versuchstag			
		0	6	14	28
I	5 C	$4 \times 10^1$		$5 \times 10^1$	$7 \times 10^1$
II		$3,5 \times 10^1$		$2,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
III		$7 \times 10^1$		$7,5 \times 10^2$	$8 \times 10^1$
IV		$7 \times 10^1$		$9 \times 10^1$	$3 \times 10^1$
I	20 C	$4 \times 10^1$		$1,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$
II		$3,5 \times 10^1$		$9,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
III		$7 \times 10^1$		$10^3$	$1,5 \times 10^2$
IV		$7 \times 10^1$		$2 \times 10^2$	$7 \times 10^1$
V	5 C	$1,8 \times 10^3$	$3 \times 10^3$		
VI		$1,8 \times 10^3$	$4 \times 10^3$		
VII		$3,5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$		

**Tabelle 9.3: Versuchsreihe FW I, Ansatz 1 (5 °C / 20 °C: Platte 1)  
Testosteron in Flusswasser**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	196,79		
0	5	214,91		
0	5	276,81	214,91	100,00
1	5	343,92		
1	5	214,91		
1	5	261,96	261,96	121,89
2	5	99,69		
2	5	57,08		
2	5	75,10	75,10	34,95
3	5	3,66		
3	5	1,38		
3	5	2,51	2,51	1,17
8	5	1,09		
8	5	0,00		
8	5	1,15	1,09	0,51
14	5	0,00		
14	5	0,00		
14	5	0,00	0,00	0,00
28	5	0,00		
28	5	0,00		
28	5	0,00	0,00	0,00
0	20	196,79		
0	20	214,91		
0	20	276,81	214,91	100,00
1	20	19,25		
1	20	19,10		
1	20	17,05	19,10	8,89
2	20	0,00		
2	20	0,00		
2	20	0,00	0,00	0,00
3	20	0,00		
3	20	0,00		
3	20	0,00	0,00	0,00
8	20	0,00		
8	20	0,00		
8	20	0,00	0,00	0,00
14	20	0,00		
14	20	0,00		
14	20	0,00	0,00	0,00
28	20	0,00		
28	20	0,00		
28	20	0,00	0,00	0,00

**Tabelle 9.4: Versuchsreihe FW I, Ansatz 2 (5 °C: Platte 1; 20 °C: Platte 2)  
Testosteron in sterilem Flusswasser**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	162,36		
0	5	140,00		
0	5	122,79	140,00	100,00
1	5	73,70		
1	5	172,21		
1	5	149,79	149,79	106,99
2	5	185,08		
2	5	201,76		
2	5	132,47	185,08	132,20
3	5	129,61		
3	5	111,63		
3	5	155,02	129,61	92,58
8	5	155,02		
8	5	133,94		
8	5	235,32	155,02	110,72
14	5	209,51		
14	5	93,86		
14	5	140,00	140,00	100,00
28	5	92,01		
28	5	79,50		
28	5	101,73	92,01	65,72
0	20	138,43		
0	20	247,72		
0	20	146,91	146,91	100,00
1	20	129,51		
1	20	139,61		
1	20	188,57	139,61	95,03
2	20	140,79		
2	20	118,42		
2	20	176,82	140,79	95,83
3	20	133,88		
3	20	149,46		
3	20	209,25	149,46	101,73
8	20	137,28		
8	20	133,88		
8	20	85,71	133,88	91,13
14	20	79,65		
14	20	96,63		
14	20	112,88	96,63	65,78
28	20	43,87		
28	20	12,70		
28	20	40,31	40,31	27,44

**Tabelle 9.5: Versuchsreihe FW II, Ansatz 1 (5 °C / 20 °C: Platte 3)  
Testosteron in Flusswasser**

Entnahmetag	Lagerungstemperatur in C	Hormonkonzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	168,47		
0	5	135,28		
0	5	119,48	135,28	100,00
1	5	111,75		
1	5	102,01		
1	5	176,40	111,75	82,61
2	5	110,29		
2	5	143,20		
2	5	131,54	131,54	97,23
3	5	61,21		
3	5	61,89		
3	5	64,71	61,89	45,75
8	5	1,40		
8	5	0,79		
8	5	0,62	0,79	0,59
14	5	0,04		
14	5	0,02		
14	5	0,00	0,02	0,01
28	5	0,00		
28	5	0,00		
28	5	0,00	0,00	0,00
0	20	168,47		
0	20	135,28		
0	20	119,48	135,28	100,00
1	20	70,06		
1	20	67,70		
1	20	98,17	70,06	51,79
2	20	3,38		
2	20	2,98		
2	20	2,93	2,98	2,20
3	20	0,06		
3	20	0,06		
3	20	0,08	0,06	0,04
8	20	0,00		
8	20	0,04		
8	20	0,01	0,01	0,01
14	20	0,00		
14	20	0,00		
14	20	0,01	0,00	0,00
28	20	0,01		
28	20	0,01		
28	20	0,00	0,01	0,00



**Tabelle 9.6: Versuchsreihe FW II, Ansatz 2 (5 °C: Platte 3; 20 °C: Platte 4)  
Testosteron in sterilem Flusswasser**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	111,75		
0	5	181,96		
0	5	165,94	165,94	100,00
1	5	135,28		
1	5	161,02		
1	5	135,28	135,28	81,53
2	5	149,56		
2	5	135,28		
2	5	126,18	135,28	81,53
3	5	124,46		
3	5	149,56		
3	5	106,04	124,46	75,00
8	5	137,21		
8	5	151,76		
8	5	190,77	151,76	91,46
14	5	127,93		
14	5	114,76		
14	5	114,76	114,76	69,16
28	5	99,43		
28	5	100,71		
28	5	116,31	100,71	60,69
0	20	79,81		
0	20	72,84		
0	20	85,61	79,81	100,00
1	20	90,86		
1	20	85,61		
1	20	84,60	85,61	107,26
2	20	72,02		
2	20	96,53		
2	20	113,60	96,53	120,95
3	20	91,96		
3	20	133,05		
3	20	121,22	121,22	151,88
8	20	40,16		
8	20	47,07		
8	20	45,67	45,67	57,22
14	20	6,71		
14	20	8,66		
14	20	6,55	6,71	8,41
28	20	1,66		
28	20	2,35		
28	20	1,69	1,69	2,12

**Tabelle 9.7: Versuchsreihe FW III, Ansatz 1 (5 °C / 20 °C: Platte 5)  
Testosteron in Flusswasser**

Entnahmetag	Lagerungstemperatur in °C	Hormonkonzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	156,52		
0	5	114,21		
0	5	130,62	130,62	100,00
1	5	80,92		
1	5	87,18		
1	5	89,39	87,18	66,74
2	5	17,43		
2	5	16,76		
2	5	21,66	17,43	13,34
3	5	0,31		
3	5	0,23		
3	5	0,21	0,23	0,17
8	5	0,10		
8	5	0,05		
8	5	0,10	0,10	0,08
14	5	0,13		
14	5	0,21		
14	5	0,13	0,13	0,10
28	5	0,37		
28	5	0,10		
28	5	0,06	0,10	0,08
0	20	156,52		
0	20	114,21		
0	20	130,62	130,62	100,00
1	20	1,98		
1	20	2,54		
1	20	2,79	2,54	1,95
2	20	0,18		
2	20	0,06		
2	20	0,10	0,10	0,08
3	20	0,02		
3	20	0,03		
3	20	0,06	0,03	0,02
8	20	0,15		
8	20	0,20		
8	20	0,27	0,20	0,15
14	20	0,20		
14	20	0,15		
14	20	0,24	0,20	0,15
28	20	0,68		
28	20	0,12		
28	20	0,25	0,25	0,19

**Tabelle 9.8: Versuchsreihe FW III, Ansatz 2 (5 °C: Platte 5; 20 °C: Platte 6)  
Testosteron in sterilem Flusswasser**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	77,05		
0	5	87,18		
0	5	111,23	87,18	100,00
1	5	158,76		
1	5	200,69		
1	5	407,22	200,69	230,21
2	5	91,67		
2	5	141,86		
2	5	70,79	91,67	105,16
3	5	127,12		
3	5	108,35		
3	5	152,15	127,12	145,82
8	5	265,72		
8	5	835,75		
8	5	324,21	324,21	371,89
14	5	117,28		
14	5	48,83		
14	5	90,52	90,52	103,84
28	5	30,34		
28	5	45,16		
28	5	230,36	45,16	51,80
0	20	154,32		
0	20	257,30		
0	20	145,60	154,32	100,00
1	20	165,66		
1	20	220,00		
1	20	154,32	165,66	107,34
2	20	149,02		
2	20	102,08		
2	20	106,56	106,56	69,05
3	20	125,62		
3	20	315,98		
3	20	349,21	315,98	204,75
8	20	198,87		
8	20	184,67		
8	20	65,79	184,67	119,66
14	20	1,37		
14	20	1,37		
14	20	2,50	1,37	0,89
28	20	2,67		
28	20	2,12		
28	20	1,47	2,12	1,38

**Tabelle 9.9: Versuchsreihe FW IV, Ansatz 1 (5 °C / 20 °C: Platte 7)  
Testosteron in Flusswasser**

Entnahmetag	Lagerungstemperatur in C	Hormonkonzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	123,53		
0	5	121,15		
0	5	139,12	123,53	100,00
1	5	42,37		
1	5	119,98		
1	5	99,28	99,28	80,37
2	5	20,05		
2	5	30,79		
2	5	31,26	30,79	24,92
3	5	0,82		
3	5	0,77		
3	5	1,34	0,82	0,66
8	5	0,37		
8	5	0,42		
8	5	0,34	0,37	0,30
14	5	0,40		
14	5	0,29		
14	5	0,37	0,37	0,30
28	5	0,36		
28	5	0,30		
28	5	0,91	0,36	0,29
0	20	123,53		
0	20	121,15		
0	20	139,12	123,53	100,00
1	20	9,79		
1	20	8,95		
1	20	10,62	9,79	7,92
2	20	0,18		
2	20	0,30		
2	20	0,27	0,27	0,22
3	20	0,26		
3	20	0,68		
3	20	0,81	0,68	0,55
8	20	0,28		
8	20	0,43		
8	20	0,39	0,39	0,32
14	20	0,38		
14	20	0,37		
14	20	0,45	0,38	0,31
28	20	0,70		
28	20	0,64		
28	20	0,83	0,70	0,57

**Tabelle 9.10: Versuchsreihe FW IV, Ansatz 2 (5 °C: Platte 7; 20 °C: Platte 8)  
Testosteron in sterilem Flusswasser**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	152,46		
0	5	196,92		
0	5	141,95	152,46	100,00
1	5	208,20		
1	5	182,41		
1	5	256,48	208,20	136,56
2	5	158,91		
2	5	238,90		
2	5	157,26	158,91	104,23
3	5	158,91		
3	5	140,53		
3	5	212,94	158,91	104,23
8	5	111,11		
8	5	169,24		
8	5	180,45	169,24	111,01
14	5	233,40		
14	5	180,45		
14	5	91,40	180,45	118,36
28	5	71,93		
28	5	97,46		
28	5	70,09	71,93	47,18
0	20	236,13		
0	20	194,75		
0	20	176,61	194,75	100,00
1	20	98,36		
1	20	88,95		
1	20	88,95	88,95	45,67
2	20	77,81		
2	20	81,33		
2	20	114,34	81,33	41,76
3	20	93,09		
3	20	174,73		
3	20	117,68	117,68	60,43
8	20	90,58		
8	20	132,34		
8	20	135,00	132,34	67,95
14	20	59,65		
14	20	68,90		
14	20	49,35	59,65	30,63
28	20	12,31		
28	20	6,23		
28	20	7,48	7,48	3,84

**Tabelle 9.11: Versuchsreihe FW I-IV, Ansatz 3  
Testosteron in Aqua bidest. bei 20 °C**

Entnahme- tag	Versuchs- reihe FW / Platte	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	I / 2	124,45		
0	I / 2	138,59		
0	I / 2	126,11	126,11	100,00
7	I / 2	126,11		
7	I / 2	91,96		
7	I / 2	102,67	102,67	81,41
14	I / 2	118,09		
14	I / 2	94,21		
14	I / 2	97,72	97,72	77,49
0	II / 4	160,24		
0	II / 4	158,84		
0	II / 4	16,02	158,84	100,00
7	II / 4	126,36		
7	II / 4	148,18		
7	II / 4	183,41	148,18	93,29
14	II / 4	108,51		
14	II / 4	146,91		
14	II / 4	145,66	145,66	91,70
0	III / 6	180,22		
0	III / 6	118,83		
0	III / 6	106,56	118,83	100,00
7	III / 6	127,03		
7	III / 6	143,93		
7	III / 6	298,80	143,93	121,12
14	III / 6	267,85		
14	III / 6	189,26		
14	III / 6	15,59	189,26	159,26
0	IV / 8	160,57		
0	IV / 8	196,92		
0	IV / 8	104,01	160,57	100,00
7	IV / 8	155,64		
7	IV / 8	167,46		
7	IV / 8	160,57	160,57	100,00
14	IV / 8	141,95		
14	IV / 8	182,41		
14	IV / 8	112,18	141,95	88,40

**Tabelle 9.12: Versuchsreihe FW I-IV, Ansatz 1a  
Eigengehalt an Testosteron im Flusswasser**

Versuchsreihe FW / Platte	I / 2			II / 4			III / 6			IV / 8		
Hormonkonzentration in pg/10 µl	0,1 1	0,0 0	0,0 0	1,0 1	0,0 0	0,0 0	0,3 6	0,0 0	0,2 4	2,4 3	0,5 2	0,8 3
Median in pg/10 µl	0,00			0,00			0,24			0,83		

**Tabelle 9.13: Versuchsreihe FW V, Ansatz 1 (5 °C: Platte 9)  
Testosteron in Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahmetag	Lagerungstemperatur in C	Hormonkonzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	235,96		
0	5	195,59		
0	5	267,56	235,96	100,00
1	5	135,82		
1	5	120,33		
1	5	204,48	135,82	57,56
1,3	5	357,12		
1,3	5	169,99		
1,3	5	213,92	213,92	90,66
2	5	169,99		
2	5	187,20		
2	5	162,16	169,99	72,04
2,3	5	4,20		
2,3	5	1,85		
2,3	5	1,20	1,85	0,78
3	5	0,98		
3	5	1,47		
3	5	1,36	1,36	0,58
3,3	5	0,55		
3,3	5	0,49		
3,3	5	0,40	0,49	0,21
4	5	0,52		
4	5	0,47		
4	5	2,29	0,52	0,22
5	5	0,75		
5	5	0,41		
5	5	0,27	0,41	0,17
6	5	0,30		
6	5	0,32		
6	5	0,33	0,32	0,13

**Tabelle 9.14: Versuchsreihe FW V, Ansatz 2 (5 °C: Platte 9)  
Testosteron in sterilem Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	113,70		
0	5	93,06		
0	5	115,31	113,70	100,00
1	5	120,33		
1	5	123,83		
1	5	169,09	123,83	108,91
1,3	5	142,02		
1,3	5	199,97		
1,3	5	197,77	197,77	173,94
2	5	95,58		
2	5	159,65		
2	5	158,01	158,01	138,97
2,3	5	137,17		
2,3	5	182,20		
2,3	5	196,68	182,20	160,25
3	5	150,12		
3	5	169,99		
3	5	21,85	150,12	132,03
3,3	5	119,76		
3,3	5	105,09		
3,3	5	109,04	109,04	95,90
4	5	108,53		
4	5	110,05		
4	5	157,20	110,05	96,79
5	5	133,83		
5	5	91,84		
5	5	84,53	91,84	80,77
6	5	125,02		
6	5	103,19		
6	5	128,70	125,02	109,96



**Tabelle 9.15: Versuchsreihe FW VI, Ansatz 1 (5 °C: Platte 10)  
 Testosteron in Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
 Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	158,32		
0	5	171,71		
0	5	180,05	171,71	100,00
1	5	209,96		
1	5	259,02		
1	5	212,63	212,63	123,83
1,3	5	215,35		
1,3	5	232,73		
1,3	5	118,63	215,35	125,42
2	5	112,68		
2	5	108,74		
2	5	112,11	112,11	65,29
2,3	5	6,13		
2,3	5	4,48		
2,3	5	4,93	4,93	2,87
3	5	5,58		
3	5	6,29		
3	5	7,64	6,29	3,66
3,3	5	1,05		
3,3	5	0,87		
3,3	5	1,15	1,05	0,61
4	5	0,32		
4	5	0,29		
4	5	0,23	0,29	0,17
5	5	0,14		
5	5	0,12		
5	5	0,07	0,12	0,07
6	5	0,09		
6	5	0,08		
6	5	0,15	0,09	0,05

**Tabelle 9.16: Versuchsreihe FW VI, Ansatz 2 (5 °C: Platte 10)  
 Testosteron in sterilem Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
 Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	140,74		
0	5	231,21		
0	5	143,08	143,08	100,00
1	5	113,26		
1	5	136,94		
1	5	120,50	120,50	84,22
1,3	5	109,30		
1,3	5	178,98		
1,3	5	192,45	178,98	125,09
2	5	84,89		
2	5	104,47		
2	5	114,42	104,47	73,01
2,3	5	123,70		
2,3	5	99,92		
2,3	5	141,51	123,70	86,45
3	5	192,45		
3	5	183,32		
3	5	144,68	183,32	128,12
3,3	5	74,33		
3,3	5	94,24		
3,3	5	115,61	94,24	65,87
4	5	107,11		
4	5	152,15		
4	5	135,46	135,46	94,67
5	5	203,46		
5	5	83,72		
5	5	99,43	99,43	69,49
6	5	66,55		
6	5	143,88		
6	5	109,30	109,30	76,39

**Tabelle 9.17: Versuchsreihe FW VII, Ansatz 1 (5 °C: Platte 11)  
 Testosteron in Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
 Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert in % (Median)
0	5	263,15		
0	5	192,63		
0	5	182,30	192,63	100,00
1	5	212,05		
1	5	147,13		
1	5	219,95	212,05	110,08
1,3	5	193,39		
1,3	5	329,19		
1,3	5	216,40	216,40	112,34
2	5	109,07		
2	5	126,90		
2	5	160,49	126,90	65,88
2,3	5	88,67		
2,3	5	125,98		
2,3	5	103,79	103,79	53,88
3	5	1,70		
3	5	1,05		
3	5	0,10	1,05	0,54
3,3	5	0,42		
3,3	5	0,34		
3,3	5	0,13	0,34	0,17
4	5	0,24		
4	5	3,32		
4	5	0,09	0,24	0,12
5	5	0,46		
5	5	0,53		
5	5	0,96	0,53	0,27
6	5	0,92		
6	5	0,21		
6	5	0,28	0,28	0,14

**Tabelle 9.18: Versuchsreihe FW VII, Ansatz 2 (5 °C: Platte 11)  
 Testosteron in sterilem Flusswasser; die Zahl (x),3 steht für die  
 Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Entnahme- tag	Lagerungs- temperatur in C	Hormon- konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	5	402,16		
0	5	585,52		
0	5	318,97	402,16	100,00
1	5	217,28		
1	5	262,03		
1	5	297,08	262,03	65,16
1,3	5	258,71		
1,3	5	256,52		
1,3	5	480,14	258,71	64,33
2	5	958,09		
2	5	279,47		
2	5	338,29	338,29	84,12
2,3	5	237,86		
2,3	5	326,23		
2,3	5	306,42	306,42	76,19
3	5	359,13		
3	5	409,96		
3	5	699,45	409,96	101,94
3,3	5	470,55		
3,3	5	265,41		
3,3	5	289,37	289,37	71,95
4	5	266,54		
4	5	436,74		
4	5	347,71	347,71	86,46
5	5	415,95		
5	5	691,50		
5	5	576,15	576,15	143,27
6	5	482,58		
6	5	359,13		
6	5	336,75	359,13	89,30

## 9.2 Verlauf der Konzentration von Testosteron in sterilisiertem Flusswasser nach Inokulation einer Bakterien-Reinkultur

**Tab. 9.19: Übersicht über das verwendete Wasser für die Versuchsreihen der einzelnen Bakterienspezies**

Tag der Wasserentnahme	Versuchsreihe											
	<i>Alcaligenes faecalis</i> / AF				<i>Aeromonas sobria</i> / AS				<i>Citrobacter freundii</i> / CF			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
30.06.04	x	x			x	x			x	x		
01.09.04			x								x	x
08.09.04				x			x	x				

**Tabelle 9.20: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE/ml) von *Alcaligenes faecalis* (AF), *Aeromonas sobria* (AS) und *Citrobacter freundii* (CF) in sterilisiertem Flusswasser mit einer Testosteronstammlösung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen und einer Lagerung bei 20 °C auf Standard I – Agarplatten**

Versuchsreihe	koloniebildende Einheiten (KbE/ml) am Versuchstag		
	0	15	28
AF I	$2,2 \times 10^9$	$10^8$	$2,4 \times 10^7$
AF II	$2,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
AF III	$2,5 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
AF IV	$1,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$
AS I	$2,5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^6$	$7 \times 10^6$
AS II	$2,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^5$	$2 \times 10^4$
AS III	$3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$
AS IV	$3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^6$	$6 \times 10^6$
CF I	$5,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	$3 \times 10^6$
CF II	$5,1 \times 10^8$	$10^8$	$7 \times 10^6$
CF III	$1,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$10^7$
CF IV	$1,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$

**Tabelle 9.21: Versuchsreihe AF I und II, Ansatz 1 (AF I: Platte 12; AF II: Platte 13)  
Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis*-Suspension, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AF I, Ansatz 1			AF II, Ansatz 1		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	116,01			186,62		
0	255,78			105,41		
0	161,31	161,31	100,00	205,98	186,62	100,00
1	202,43			144,01		
1	418,36			184,03		
1	251,48	251,48	155,90	121,38	144,01	77,17
2	186,52			119,82		
2	231,18			105,41		
2	93,73	186,52	115,63	162,58	119,82	64,21
5	114,24			124,58		
5	133,41			260,02		
5	144,32	133,41	82,71	162,58	162,58	87,12
7	243,13			112,35		
7	131,34			176,53		
7	166,56	166,56	103,26	115,27	115,27	61,77
15	52,87			46,51		
15	21,98			77,29		
15	49,93	49,93	30,95	57,34	57,34	30,72
28	4,74			18,40		
28	4,68			14,94		
28	4,56	4,68	2,90	20,53	18,40	9,86

**Tabelle 9.22: Versuchsreihe AF I und II, Ansatz 2 (Platte 16)**  
**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AF I, Ansatz 2			AF II, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	236,59	236,59	100,00	227,79	227,79	100,00
0	216,68			316,19		
0	245,82			196,42		
1	265,68	249,00	105,24	103,38	122,71	53,87
1	245,82			187,18		
1	249,00			122,71		
2	272,75	206,24	87,17	107,85	134,00	58,83
2	198,82			134,00		
2	206,24			227,79		
5	265,68	219,39	92,73	143,30	178,47	78,35
5	184,95			178,47		
5	219,39			255,51		
7	187,18	245,82	103,90	295,44	295,44	129,70
7	276,38			311,90		
7	245,82			224,95		
15	93,14	106,71	45,10	113,76	198,82	87,28
15	106,71			198,82		
15	126,80			211,38		
28	24,95	22,48	9,50	26,75	26,75	11,74
28	22,48			20,45		
28	19,09			29,72		

**Tabelle 9.23: Versuchsreihe AF III, Ansatz 1 und 2 (Platte 19)**

**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AF III, Ansatz 1			AF III, Ansatz 2		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	260,10			257,74		
0	206,40			316,48		
0	237,62	237,62	100,00	366,23	316,48	100,00
1	264,90			409,01		
1	211,86			147,76		
1	316,48	264,90	111,48	151,39	151,39	47,83
2	267,34			151,39		
2	180,05			181,57		
2	146,57	180,05	75,77	208,20	181,57	57,37
5	94,44			262,49		
5	151,39			204,63		
5	174,12	151,39	63,71	231,35	231,35	73,10
6	79,30			144,23		
6	202,86			155,12		
6	184,67	184,67	77,71	137,48	144,23	45,57
7	66,93			2,16		
7	186,24			153,87		
7	63,75	66,93	28,16	168,42	153,87	48,62
8	53,40			157,68		
8	63,75			148,95		
8	82,80	63,75	26,83	96,56	148,95	47,07
15	11,87			17,53		
15	15,86			15,23		
15	16,14	15,86	6,68	21,34	17,53	5,54
28	3,89			4,41		
28	3,48			3,89		
28	3,72	3,72	1,57	5,31	4,41	1,39



**Tabelle 9.24: Versuchsreihe AF IV, Ansatz 1 und 2 (Platte 20)**

**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Alcaligenes faecalis*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AF IV, Ansatz 1			AF IV, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	146,76	146,76	100,00	169,71	237,03	100,00
0	146,76			237,03		
0	116,21			290,06		
1	108,33	87,73	59,78	287,45	312,04	131,65
1	87,73			501,95		
1	87,15			312,04		
2	74,05	124,83	85,06	245,30	245,30	103,49
2	284,88			471,14		
2	124,83			227,19		
5	162,00	162,00	110,39	110,62	253,94	107,14
5	189,58			290,06		
5	103,91			253,94		
6	87,15	87,15	59,39	377,27	323,84	136,63
6	90,71			265,30		
6	70,82			323,84		
7	227,19	177,89	121,21	329,96	279,81	118,05
7	135,24			279,81		
7	177,89			177,89		
8	179,30	72,65	49,50	1492,04	523,97	221,06
8	72,65			237,03		
8	66,92			523,97		
15	101,79	101,79	69,36	202,27	326,88	137,91
15	62,87			326,88		
15	202,27			529,67		
28	105,36	105,36	71,79	309,18	345,92	145,94
28	91,32			345,92		
28	135,24			362,90		

**Tabelle 9.25: Versuchsreihe AS I und II, Ansatz 1 (AS I: Platte 12; AS II: Platte 13)  
Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria*-Suspension, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AS I, Ansatz 1			AS II, Ansatz 1		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	156,24			133,01		
0	156,24			138,38		
0	227,34	156,24	100,00	149,91	138,38	100,00
1	107,45			144,01		
1	239,07			95,31		
1	163,91	163,91	104,91	260,02	144,01	104,07
2	180,56			136,56		
2	135,52			119,82		
2	158,75	158,75	101,61	100,21	119,82	86,59
5	269,19			110,92		
5	139,84			98,96		
5	219,89	219,89	140,74	181,49	110,92	80,16
7	212,71			82,15		
7	337,37			248,69		
7	166,56	212,71	136,15	208,93	208,93	150,98
15	59,32			126,21		
15	79,51			164,81		
15	116,01	79,51	50,89	184,03	164,81	119,10
28	36,60			134,77		
28	54,41			44,94		
28	50,65	50,65	32,42	91,81	91,81	66,34

**Tabelle 9.26: Versuchsreihe AS I und II, Ansatz 2 (Platte 14)  
Testosteron in sterilisiertem Flusswasser, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AS I, Ansatz 2			AS II, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	49,56	49,56	100,00	58,99	58,99	100,00
0	49,56			42,77		
0	84,82			136,52		
1	80,61	95,73	193,16	77,29	83,39	141,38
1	95,73			108,38		
1	100,92			83,39		
2	64,99	64,99	131,13	36,44	44,11	74,78
2	176,23			44,11		
2	48,41			67,69		
5	52,77	61,90	124,90	125,45	125,45	212,67
5	68,81			151,77		
5	61,90			50,74		
7	96,57	88,54	178,65	44,11	67,14	113,83
7	88,54			72,30		
7	65,52			67,14		
15	114,42	48,41	97,68	62,91	51,95	88,07
15	48,41			51,95		
15	38,14			49,95		
28	58,05	58,05	117,13	116,53	64,46	109,28
28	51,14			64,46		
28	69,95			34,82		

**Tabelle 9.27: Versuchsreihe AS III, Ansatz 1 und 2 (Platte 17)**

**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AS III, Ansatz 1			AS III, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	58,25	159,02	100,00	105,83	105,83	100,00
0	226,55			87,51		
0	159,02			120,28		
1	204,03	255,47	160,65	71,60	47,33	44,73
1	255,47			41,99		
1	268,37			47,33		
2	179,25	87,11	54,77	69,40	79,08	74,72
2	87,11			79,08		
2	69,71			86,70		
5	80,90	80,90	50,88	108,43	108,43	102,46
5	64,38			107,91		
5	86,70			115,02		
6	116,74	86,30	54,27	53,70	55,33	52,28
6	86,30			55,33		
6	82,40			70,02		
7	42,51	42,51	26,73	60,30	80,90	76,45
7	27,39			80,90		
7	58,76			107,38		
8	55,33	101,82	64,03	115,59	115,59	109,22
8	112,77			119,68		
8	101,82			51,69		
15	62,71	53,25	33,49	58,51	73,55	69,50
15	53,25			73,55		
15	43,03			93,01		
28	34,99	49,56	31,17	78,72	78,72	74,38
28	52,35			105,83		
28	49,56			62,17		

**Tabelle 9.28: Versuchsreihe AS IV, Ansatz 1 und 2 (Platte 18)**

**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Aeromonas sobria*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	AS IV, Ansatz 1			AS IV, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	8,21	15,38	100,00	3,13	4,20	100,00
0	15,38			4,68		
0	16,29			4,20		
1	6,76	3,44	22,37	3,45	9,06	215,59
1	3,44			9,06		
1	3,05			10,24		
2	2,32	3,72	24,21	5,42	5,42	128,96
2	4,20			6,39		
2	3,72			4,63		
5	6,27	4,68	30,43	4,05	4,05	96,32
5	4,68			4,90		
5	2,98			3,13		
6	3,23	3,11	20,19	7,67	7,67	182,44
6	3,11			4,78		
6	2,01			8,45		
7	6,03	5,73	37,24	6,44	4,44	105,67
7	3,42			4,44		
7	5,73			3,93		
8	4,80	3,57	23,19	4,04	4,04	96,00
8	3,57			2,71		
8	3,23			6,61		
15	2,17	2,05	13,33	5,64	10,60	252,23
15	1,48			12,71		
15	2,05			10,60		
28	1,94	1,94	12,60	7,61	7,00	166,64
28	1,98			7,00		
28	1,81			4,40		

**Tabelle 9.29: Versuchsreihe CF I und II, Ansatz 1 (CF I: Platte 12; CF II: Platte 13)  
Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii*-Suspension, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	CF I, Ansatz 1			CF II, Ansatz 1		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	293,36	216,27	100,00	342,79	224,50	100,00
0	216,27			224,50		
0	85,66			149,91		
1	48,53	166,56	77,02	87,37	96,51	42,99
1	166,56			140,23		
1	368,70			96,51		
2	163,91	255,78	118,27	169,39	218,11	97,15
2	255,78			218,11		
2	273,84			267,92		
5	15,04	19,18	8,87	169,39	160,38	71,44
5	19,18			160,38		
5	66,64			79,19		
7	52,87	107,45	49,68	78,24	78,24	34,85
7	107,45			78,24		
7	227,34			136,56		
15	45,84	45,84	21,20	43,92	33,83	15,07
15	17,22			33,83		
15	212,71			27,67		
28	4,94	131,34	60,73	10,40	10,40	4,63
28	131,34			9,31		
28	278,58			13,69		

**Tabelle 9.30: Versuchsreihe CF I und II, Ansatz 2 (Platte 15)**  
**Testosteron in sterilisiertem Flusswasser, Lagerung bei 20 °C**

Versuch	CF I, Ansatz 2			CF II, Ansatz 2		
Entnahmetag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	237,61	276,12	100,00	205,67	205,67	100,00
0	510,82			255,94		
0	276,12			154,75		
1	240,54	240,54	87,11	156,46	193,97	94,31
1	310,39			193,97		
1	153,06			237,61		
2	200,89	234,71	85,00	191,74	191,74	93,22
2	234,71			402,96		
2	252,76			124,90		
5	391,66	283,30	102,60	265,79	265,79	129,23
5	283,30			229,06		
5	246,56			314,53		
7	365,15	220,91	80,00	552,23	552,23	268,50
7	218,27			365,15		
7	220,91			570,03		
15	104,91	153,06	55,43	240,54	240,54	116,96
15	153,06			140,34		
15	181,02			336,33		
28	49,96	58,69	21,26	127,55	127,55	62,02
28	58,69			119,81		
28	62,56			189,53		

**Tabelle 9.31: Versuchsreihe CF III, Ansatz 1 und 2 (Platte 21)  
 Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	CF III, Ansatz 1			CF III, Ansatz 2		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	155,17	247,95	100,00	155,17	155,17	100,00
0	247,95			234,54		
0	432,27			74,61		
1	333,01	333,01	134,31	122,61	180,10	116,06
1	480,09			303,82		
1	333,01			180,10		
2	241,12	241,12	97,25	313,15	378,20	243,73
2	366,15			378,20		
2	216,17			516,17		
5	303,82	303,82	122,54	343,58	303,82	195,80
5	294,87			303,82		
5	322,87			180,10		
6	270,04	270,04	108,91	294,87	184,74	119,06
6	270,04			134,49		
6	137,68			184,74		
7	184,74	184,74	74,51	241,12	343,58	221,42
7	125,45			432,27		
7	255,03			343,58		
8	189,54	216,17	87,18	210,47	184,74	119,06
8	216,17			134,49		
8	262,40			184,74		
15	73,09	66,04	26,63	17,21	19,62	12,64
15	53,11			19,62		
15	66,04			27,39		
28	7,61	10,48	4,23	13,22	12,97	8,36
28	10,48			12,97		
28	14,26			10,08		



**Tabelle 9.32: Versuchsreihe CF IV, Ansatz 1 und 2 (Platte 22)  
 Testosteron in sterilisiertem Flusswasser mit einer *Citrobacter freundii*-Suspension (Ansatz 1) und Testosteron in sterilisiertem Flusswasser (Ansatz 2), Lagerung bei 20 °C**

Versuch	CF IV, Ansatz 1			CF IV, Ansatz 2		
Entnahme- tag	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert	Hormon (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	223,31			246,23		
0	246,23			38,73		
0	301,75	246,23	100,00	135,46	135,46	100,00
1	258,80			114,36		
1	471,61			234,42		
1	129,78	258,80	105,11	193,72	193,72	143,01
2	419,34			168,83		
2	374,41			141,45		
2	335,55	374,41	152,06	258,80	168,83	124,64
5	234,42			234,42		
5	318,07			141,45		
5	258,80	258,80	105,11	234,42	234,42	173,05
6	335,55			176,67		
6	161,42			129,78		
6	354,29	335,55	136,28	147,76	147,76	109,07
7	203,01			141,45		
7	9,05			141,45		
7	176,67	176,67	71,75	193,72	141,45	104,42
8	154,41			168,83		
8	223,31			176,67		
8	203,01	203,01	82,45	184,95	176,67	130,42
15	109,70			25,90		
15	41,70			24,07		
15	93,19	93,19	37,85	26,86	25,90	19,12
28	17,30			0,64		
28	14,91			3,69		
28	14,91	14,91	6,05	3,19	3,19	2,36

### 9.3 Verlauf der Konzentrationen von Testosteron, Östron und Progesteron im Flusswasser

**Tabelle 9.33: Übersicht über das verwendete Wasser und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE/ml) für die Versuchsreihen H I und II über den Versuchszeitraum von 28 Tagen und einer Lagerung bei 5 °C auf Standard I – Agarplatten**

Versuchsreihe	Tag der Wasserentnahme	Temperatur / pH-Wert des Wassers	koloniebildende Einheiten (KbE/ml) am Versuchstag			
			0	7	14	28
H I	18.01.05	6,8 C / 8,31	$2,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$2 \times 10^1$	-
H II	25.01.05	7,4 C / 8,24	$1,5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$6 \times 10^1$	$3,2 \times 10^2$

**Tabelle 9.34: Versuchsreihe H I, Testosteron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 23)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des  
jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	164,88		
0	86,26		
0	144,12	144,12	100,00
1	59,21		
1	181,48		
1	102,82	102,82	71,34
1,3	108,19		
1,3	152,04		
1,3	169,43	152,04	105,49
2	74,43		
2	118,37		
2	65,16	74,43	51,65
2,3	142,21		
2,3	98,99		
2,3	140,34	140,34	97,38
3	144,12		
3	150,01		
3	58,51	144,12	100,00
3,3	126,32		
3,3	51,99		
3,3	45,19	51,99	36,08
4	51,38		
4	65,16		
4	55,80	55,80	38,72
5	0,47		
5	0,04		
5	0,15	0,15	0,10
6	0,03		
6	0,02		
6	0,01	0,02	0,02
7	0,00		
7	0,94		
7	0,69	0,69	0,48
8	0,08		
8	1,01		
8	0,35	0,35	0,24
9	0,38		
9	0,19		
9	0,26	0,26	0,18

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	0,83		
10	1,44		
10	0,07	0,83	0,57
11	0,63		
11	0,20		
11	0,70	0,63	0,44
12	0,41		
12	0,25		
12	0,72	0,41	0,29
13	1,46		
13	0,74		
13	1,19	1,19	0,83
14	0,44		
14	0,90		
14	0,70	0,70	0,49
28	0,39		
28	0,31		
28	2,82	0,39	0,27

**Tabelle 9.35: Versuchsreihe H I, Östron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 24)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des  
jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	360,43		
0	460,43		
0	456,53	456,53	100,00
1	343,98		
1	430,45		
1	403,04	403,04	88,28
1,3	437,69		
1,3	585,68		
1,3	511,01	511,01	111,93
2	399,78		
2	502,06		
2	363,27	399,78	87,57
2,3	437,69		
2,3	413,03		
2,3	437,69	437,69	95,87
3	718,70		
3	468,37		
3	441,37	468,37	102,59
3,3	452,68		
3,3	419,88		
3,3	441,37	441,37	96,68
4	331,02		
4	409,67		
4	625,83	409,67	89,73
5	544,10		
5	596,77		
5	468,37	544,10	119,18
6	426,89		
6	468,37		
6	333,56	426,89	93,51
7	343,98		
7	756,67		
7	580,25	580,25	127,10
8	529,56		
8	539,19		
8	472,41	529,56	116,00
9	564,36		
9	569,58		
9	445,10	564,36	123,62

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	663,40		
10	464,38		
10	539,19	539,19	118,11
11	393,37		
11	338,72		
11	416,44	393,37	86,16
12	380,94		
12	326,02		
12	464,38	380,94	83,44
13	366,13		
13	387,09		
13	371,96	371,96	81,48
14	236,74		
14	261,37		
14	222,42	236,74	51,86
28	10,47		
28	14,84		
28	5,36	10,47	2,29

**Tabelle 9.36: Versuchsreihe H I, Progesteron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 25)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des  
jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	212,26		
0	212,26		
0	213,95	212,26	100,00
1	169,20		
1	265,96		
1	253,25	253,25	119,31
1,3	197,71		
1,3	303,67		
1,3	215,66	215,66	101,60
2	220,87		
2	265,96		
2	226,22	226,22	106,58
2,3	311,42		
2,3	314,05		
2,3	253,25	311,42	146,71
3	298,62		
3	200,85		
3	249,17	249,17	117,39
3,3	369,58		
3,3	224,42		
3,3	259,51	259,51	122,26
4	241,24		
4	306,22		
4	298,62	298,62	140,68
5	229,87		
5	330,44		
5	231,72	231,72	109,17
6	212,26		
6	407,15		
6	194,63	212,26	100,00
7	363,21		
7	363,21		
7	270,36	363,21	171,11
8	190,12		
8	222,64		
8	191,61	191,61	90,27
9	245,17		
9	241,24		
9	175,87	241,24	113,65

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	360,08		
10	296,14		
10	255,32	296,14	139,51
11	30,49		
11	24,15		
11	32,02	30,49	14,37
12	35,83		
12	29,75		
12	40,98	35,83	16,88
13	13,40		
13	4,45		
13	12,02	12,02	5,66
14	12,51		
14	10,63		
14	11,66	11,66	5,49
28	4,57		
28	9,88		
28	4,90	4,90	2,31

**Tabelle 9.37: Versuchsreihe H II, Testosteron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 26)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des  
jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	45,34		
0	39,42		
0	85,98	45,34	100,00
1	126,96		
1	61,48		
1	97,09	97,09	214,14
1,3	60,48		
1,3	300,98		
1,3	90,55	90,55	199,73
2	52,29		
2	104,17		
2	260,04	104,17	229,77
2,3	46,79		
2,3	113,89		
2,3	83,09	83,09	183,25
3	24,42		
3	19,68		
3	6,36	19,68	43,41
3,3	3,56		
3,3	4,35		
3,3	2,18	3,56	7,85
4	0,51		
4	0,51		
4	0,40	0,51	1,12
5	0,48		
5	0,45		
5	0,45	0,45	1,00
6	0,38		
6	0,40		
6	0,27	0,38	0,83
7	0,51		
7	1,01		
7	0,81	0,81	1,79
8	0,82		
8	0,76		
8	0,84	0,82	1,81
9	0,69		
9	0,96		
9	0,76	0,76	1,68

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	7,23		
10	12,12		
10	6,04	7,23	15,96
11	5,81		
11	4,24		
11	1,82	4,24	9,35
12	1,01		
12	1,23		
12	1,57	1,23	2,72
13	1,43		
13	0,93		
13	2,23	1,43	3,15
14	2,71		
14	2,21		
14	5,32	2,71	5,99
28	4,40		
28	1,23		
28	1,13	1,23	2,72

**Tabelle 9.38: Versuchsreihe H II, Östron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 27)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des  
jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	475,22		
0	454,91		
0	505,62	475,22	100,00
1	377,43		
1	596,08		
1	569,00	569,00	119,73
1,3	435,68		
1,3	661,86		
1,3	458,88	458,88	96,56
2	466,96		
2	574,28		
2	492,30	492,30	103,59
2,3	701,77		
2,3	681,43		
2,3	553,50	681,43	143,39
3	655,50		
3	439,44		
3	543,48	543,48	114,36
3,3	353,36		
3,3	483,66		
3,3	574,28	483,66	101,78
4	538,55		
4	618,97		
4	643,02	618,97	130,25
5	487,96		
5	303,26		
5	492,30	487,96	102,68
6	450,98		
6	374,32		
6	406,98	406,98	85,64
7	333,82		
7	842,46		
7	596,08	596,08	125,43
8	410,43		
8	487,96		
8	413,92	413,92	87,10
9	579,64		
9	533,68		
9	377,43	533,68	112,30

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	333,82		
10	284,74		
10	245,84	284,74	59,92
11	34,01		
11	26,83		
11	35,67	34,01	7,16
12	40,43		
12	33,47		
12	43,66	40,43	8,51
13	14,86		
13	8,10		
13	13,29	13,29	2,80
14	13,71		
14	11,84		
14	13,16	13,16	2,77
28	5,03		
28	11,22		
28	5,50	5,50	1,16

**Tabelle 9.39: Versuchsreihe H II, Progesteron in Flusswasser bei 5 °C (Platte 28)  
die Zahl (x),3 steht für die Probenentnahme am Nachmittag des jeweiligen Tages x**

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
0	11,27		
0	26,23		
0	12,61	12,61	100,00
1	17,92		
1	32,81		
1	24,75	24,75	196,26
1,3	27,49		
1,3	18,55		
1,3	20,56	20,56	163,09
2	16,36		
2	21,04		
2	21,04	21,04	166,89
2,3	21,78		
2,3	17,32		
2,3	23,08	21,78	172,77
3	41,22		
3	18,98		
3	12,61	18,98	150,50
3,3	12,05		
3,3	22,82		
3,3	12,19	12,19	96,68
4	11,52		
4	16,17		
4	18,13	16,17	128,27
5	19,20		
5	15,46		
5	31,67	19,20	152,23
6	26,85		
6	13,49		
6	12,05	13,49	107,00
7	14,60		
7	18,34		
7	26,23	18,34	145,42
8	27,49		
8	22,82		
8	25,04	25,04	198,56
9	4,59		
9	7,44		
9	8,61	7,44	59,03

Probe an Tag	Konzentration (pg/10 µl Wasser)	Median (pg/10 µl Wasser)	Wert (Median) in % vom Ausgangswert
10	23,08		
10	21,78		
10	23,90	23,08	183,05
11	2,66		
11	1,92		
11	2,85	2,66	21,08
12	3,34		
12	2,57		
12	2,60	2,60	20,60
13	0,85		
13	0,42		
13	0,50	0,50	3,93
14	0,07		
14	0,05		
14	0,18	0,07	0,56
28	0,03		
28	0,02		
28	0,04	0,03	0,27



## **Danksagung**

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Gerd Schlenker für die Vergabe des Themas, für die sehr gute Betreuung und nicht zuletzt für seine Geduld bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Norbert Mieth für weit reichende Einblicke und die ausführliche Beratung bezüglich der statistischen Auswertung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tier- und Umwelthygiene, insbesondere Heike Jansen, danke ich für die allseits freundliche und entspannte Unterstützung bei Arbeiten im und Fragen zum Labor.

Und meiner Familie danke ich, generell und überhaupt.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Eggstedt, den 29.09.2010

Heike Poltrock