

2 Literaturübersicht

2.1 Endokrine Disruptoren

Beim Europäischen Workshop „Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife“ in Weybridge 1996 einigten sich Vertreter aus Wissenschaft und Behörden der EU, USA und Japans sowie von Institutionen, wie OECD und WHO auf folgende Definition (Reisner-Oberlehner, 1998; Kuch und Ballschmiter, 1999):

Ein endokriner Disruptor (engl. „endocrine disruptor“), auch Umwelthormon genannt, ist eine exogene Substanz oder ein Gemisch, welche die Funktionen des endokrinen Systems verändert und damit nachteilige gesundheitliche Effekte in einem gesunden Organismus oder dessen Nachkommen hervorruft.

Etwas umfassender ist die Definition einer amerikanischen Expertengruppe: Ein endokriner Disruptor ist ein exogenes Agens, welches sich bei Produktion, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Wirkung oder Eliminierung von natürlichen Hormonen einmischt, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind (Kavlock et al., 1996).

Endokrine Disruptoren mit östrogenem Potenzial werden in folgende Gruppen eingeteilt: Xenoöstrogene, Phytoöstrogene, synthetische Östrogene und natürliche Östrogene.

2.2 Östrogene und östrogen wirksame Substanzen

2.2.1 Xenoöstrogene

Das Interesse an endokrinen Disruptoren hat sich in den letzten Jahren vor allem auf synthetische Chemikalien mit östrogenen Wirkung konzentriert (Gülden et al., 1997). Diese werden als Xenoöstrogene bezeichnet. Die östrogene Wirksamkeit ist aufgrund der Struktur nicht vorhersagbar (Clark et al., 1980). Sie gleicht nicht der Struktur von Östrogenen, aber da die Xenoöstrogene an den Östrogenrezeptor binden, können sie das endokrine System beeinflussen (Korach et al., 1987; Mueller und Korach, 2001). Bei mehreren hundert Substanzen ist die östrogene Wirksamkeit bereits nachgewiesen (Gülden et al., 1997), aber es werden ca. 80.000 synthetische Substanzen regelmäßig verwendet und jedes Jahr kommen etwa 1000 weitere hinzu (Sumpter, 1998). Xenoöstrogene kommen in Pestiziden (z. B. DDT), Detergentien (z. B. Alkylphenole), Kunststoffen (z. B. Phtalate), Verpackungen von Lebensmitteln (z. B. Bisphenol A) und in vielen anderen Gegenständen des täglichen Lebens vor. Sie gelangen in die Umwelt und belasten vor allem die Oberflächengewässer (Wuttke et al., 1999). Zwei typische Beispiele dafür sind Alkylphenole und Bisphenol A. Sie werden in großen Mengen produziert und im Klärwerk nicht vollständig abgebaut (Naylor et al., 1992; Ahel et al., 1994 a; Bundesumweltamt, 1997). Alkylphenole, Bisphenol A und viele weitere Xenoöstrogene werden im Abfluss von Kläranlagen, in Flüssen, in der Nordsee und

z. T. sogar im Trinkwasser nachgewiesen (Clark et al., 1992; Ahel et al., 1994 b; Ternes, 1998; Fürhacker et al., 2000; Rodgers Gray et al., 2000; Heemken et al., 2001). Während des Abbaus von Alkylphenolen entstehen Metabolite, die für die aquatische Fauna noch schädlicher sind als die Ausgangssubstanz selbst (Yoshimura, 1986). In der Umwelt wird eine Vielzahl von Störungen bei wildlebenden Tieren durch Xenoöstrogene beobachtet. DDT reichert sich in der Nahrungskette an und hat z. B. den Weißkopfseeadler besonders geschädigt. Durch eine Verdünnung der Eierschalen kam es zu einer verminderten Überlebensrate von Embryonen und Küken, wodurch die Populationsgröße drastisch zurückging (Faber und Hickey, 1973). In Tierversuchen wurden Störungen durch Xenoöstrogene ebenfalls nachgewiesen. Beispielsweise wurden Bisphenol A, Arochlor 1016 oder Octylphenol an trächtige Mäuse verfüttert. Die Nachkommen wiesen veränderte Geschlechtsorgane auf und zeigten Verhaltensänderungen (Saal et al. 1998; Gupta, 2000). Chlordane, trans-Nonachlor oder polychlorierten Biphenole wurden in Schildkröteneier injiziert. Es schlüpften Jungtiere mit veränderten Hormonkonzentrationen (Willingham et al., 2000). Der Mensch nimmt über die Nahrung Xenoöstrogene auf, so z. B. mit Lebensmitteln, denen das Antioxidans Butylhydroxyanisol zugesetzt wurde, oder Xenoöstrogene, die wegen ihres ubiquitären Vorkommens in Lebensmittel gelangt sind. Sie können auch als Bestandteile von Verpackungsmaterialien in Lebensmittel migrieren, wie Bisphenol A und verschiedene Phthalsäureester. Auch Kosmetika können Xenoöstrogene enthalten, z. B. Alkylphenole. Es ist möglich, dass eine Substanz mit östrogener Wirksamkeit dermal besser bioverfügbar ist und eine längere Verweildauer im Körper hat als bei oraler Aufnahme (Böhme, 1998). Zudem wurden Bestandteile von Kosmetika in Brustkrebsgewebe nachgewiesen (Harvey und Darbre, 2004).

2.2.2 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogener Wirkung und wurden bereits 1954 von Bradbury und White in 53 Pflanzen beschrieben. Heute sind weit mehr als 300 Pflanzen bekannt, die Phytoöstrogene enthalten (Metzler und Pfeiffer, 2001). Vor allem Hülsenfrüchte (z. B. Sojabohnen), Kirschen und Getreide (Hafer, Gerste, Roggen, Weizen) enthalten sehr hohe Konzentrationen von Phytoöstrogenen. Die drei hauptsächlichen Stoffklassen der Phytoöstrogene stellen Isoflavone, Coumestane und Lignane dar. Es handelt sich um Diphenole, die eine gewisse Ähnlichkeit mit der Struktur von natürlichen Östrogenen haben (Przyrembel, 1998) und an Östrogenrezeptoren von Tieren und Menschen binden können (Lange et al., 2003). Stumpf et al. (1996) analysierten Phytoöstrogene in verschiedenen Gewässertypen. Im Klärwerk erfolgte eine Eliminierung von nur 58 %. Die im Wasser vorkommenden Phytoöstrogene stammen hauptsächlich aus Holz, Hopfen, Mais und

Kautschuk. Außerdem werden sie von der Fett- und Papierindustrie freigesetzt und in Arzneimitteln eingesetzt (Sattelberger et al., 1998).

Die in der menschlichen Nahrung enthaltenen Phytoöstrogene zeigen zwar eine sehr geringe Wirkungsintensität, sie können jedoch, verglichen mit den Xenoöstrogenen, in Abhängigkeit von den Ernährungsgewohnheiten in erheblich größeren Mengen aufgenommen werden (Greim, 1998). Erste Hinweise auf die biologische Wirksamkeit von Phytoöstrogenen lieferte die Beobachtung einer stark reduzierten Fertilität bei australischen Schafen nach Aufnahme einer bestimmten Kleesorte (Price und Fenwick, 1985). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Phytoöstrogene als Nahrungsbestandteile bei Menschen und Tieren sowohl östrogen-agonistisch als auch -antagonistisch wirken können, abhängig vom Lebenszeitpunkt während der Exposition, der Dauer der Aufnahme und der Konzentration (Greim, 1998; Ward und Thompson, 2001). Epidemiologische Studien erbrachten Hinweise auf eine protektive Funktion von Phytoöstrogenen gegenüber Kolon-, Lungen-, Magen- und Prostatakrebs (Greim, 1998). Positive Wirkungen zahlreicher Pflanzenextrakte werden in der Therapie von klimakterischen Beschwerden genutzt (Wuttke et al., 1999). Der Mangel an schädlichen Effekten durch Phytoöstrogene kann durch adaptive Phänomene während der Ko-Evolution von Pflanzen und Säugetieren erklärt werden (Shutt, 1976).

Durch Verschimmeln von Lebensmitteln können Mykoöstrogene in die Nahrung gelangen, die eine starke östrogene Wirkung entfalten. Das Vorkommen der Mykoöstrogene hängt von den klimatischen Bedingungen ab. Besonders in Jahren mit sehr feuchten Sommern wird ein starker Pilzbefall von Getreidepflanzen und anderen Nutzpflanzen beobachtet. Das Ansteigen des Mykoöstrogengehalts korreliert mit dem Pilzbefall (Jungbauer und Graumann, 1998). Verschiedene *Fusarium*-Arten infizieren häufig Getreide und produzieren Zearalenone. Diese Mykoöstrogene werden für Fruchtbarkeitsstörungen bei Schweinen verantwortlich gemacht (Metzler und Pfeiffer, 2001).

2.2.3 Synthetische Östrogene

Therapeutisch und prophylaktisch werden neben natürlichen vor allem synthetische Östrogene wie Konjugate und Derivate des Östradiols verabreicht. Letztere werden im Körper zum freien Sexualhormon hydrolysiert (Stumpf et al., 1996). Die Anwendung von Östrogenen in der Veterinärmedizin ist in der EU durch die Richtlinie 96/22/EG sehr eingeschränkt. Bei lebensmittelliefernden Tieren dürfen diese nur für zootecnische Maßnahmen wie bei der Vorbereitung von Spendertieren zum Embryotransfer oder zur Brunstsynchronisation angewendet werden. Dagegen ist der Einsatz von Hormonen zur Erzielung anaboler Effekte bei lebensmittelliefernden Tieren in der EU verboten. Der illegale Einsatz von anabol wirkenden Substanzen beschränkt sich auf Einzelfälle, da Bestände und Schlachthöfe durch den Rückstandskontrollplan nach der Richtlinie 96/23/EG routinemäßig

durch entsprechende Analysen überwacht werden (Kroker und Schmädicke, 1998). In den USA und anderen Ländern (Kanada, Australien, Neuseeland) ist der Einsatz von Hormonen zur Steigerung der Fleischproduktion etabliert. Neben natürlichen Hormonen wie Östradiol, Testosteron und Progesteron werden auch synthetische Steroide eingesetzt (Römbke et al., 1996; Lange et al., 2002). α -Zearalenol (Mycööstrogen) und das synthetische Zeranol werden ebenfalls verwendet. Die biologische Wirksamkeit von Zeranol ist genauso hoch wie von 17β -Östradiol (Leffers et al., 2001).

Es gibt eine Debatte über die positiven und negativen Wirkungen der Hormonsubstitutionstherapie in der Humanmedizin. Positive Wirkungen werden bei der Therapie gegen Osteoporose, kardiovaskuläre Krankheiten, Inkontinenz, Alzheimer und andere neurodegenerative Krankheiten genutzt. Das Risiko an Brust- und Gebärmutterkrebs zu erkranken, scheint durch eine Hormonsubstitutionstherapie zu steigen (Gustafsson, 2000 b). Die Verordnungen von Östrogenen in der Humanmedizin sind in Deutschland von 125 Millionen Tagesdosen (1984) auf 945 Millionen Tagesdosen (1993) gestiegen (ab 1991 wurden die neuen Bundesländer mitgezählt). Die Verordnungen von Kontrazeptiva sind ebenfalls stark angestiegen (Schwabe und Paffrath, 1994).

Eines der wichtigsten synthetischen, oral wirksamen Östrogene ist das Kontrazeptivum Ethinylöstradiol (Sattelberger et al., 1998). Es wird genauso wie das natürliche Hormon ausgeschieden, so dass in Abwässern von Ballungsräumen diese Substanz eindeutig nachgewiesen werden konnte (Jungbauer und Graumann, 1998). Der Eintrag von synthetischen Östrogenen in Klärwerke übersteigt den Eintrag von natürlichen Östrogenen erheblich. In Flüssen können synthetische Östrogene seltener nachgewiesen werden. Sie überschreiten Werte von 5 ng/l nicht (Aherne und Briggs, 1989; Stumpf et al., 1996). Nach Herstellerangaben ist eine Wirkung in der aquatischen Umwelt ab einer Konzentration von 0,1 ng/l nicht ausgeschlossen (Kalbfus, 1998).

In verschiedenen Tierversuchen konnten negative Wirkungen auf weibliche und männliche Nachkommen bestätigt werden. So verursacht 17α -Ethinylöstradiol bei Flohkrebsen histologische Veränderungen im Reproduktionstrakt (Vandenbergh et al., 2003) und bei männlichen Mäusen, welche pränatal subklinischen Konzentrationen ausgesetzt wurden, ein verändertes Prostatawachstum und eine reduzierte Spermienzahl während der Adoleszenz (Thayer et al., 2001).

Diethylstilböstrol (DES) ist ein synthetisches Östrogen, das von 1948 bis 1971 zur Prävention von spontanen Aborten bei Frauen verschrieben wurde. Als die Töchter der behandelten Mütter unter verschiedenen Störungen wie abnormalen Schwangerschaften und verminderter Fertilität litten, wurde DES verboten. Die DES-Problematik stellt ein Beispiel dar, wie eine östrogen wirksame Substanz auf Organismen in frühen Lebensstadien

wirken kann und die Effekte erst dann sichtbar werden, wenn die Fortpflanzungsorgane entwickelt sind und die sexuelle Reifung eintritt. Diese zeitliche Abkopplung der Phase, in der ein Organismus einem endokrinen Disruptor ausgesetzt ist, von dem Zeitpunkt, zu dem ein Effekt beobachtet werden kann, macht es besonders bei langlebigen Organismen schwierig, Ursache und Wirkung zu verknüpfen (Gies et al., 1997).

2.2.4 Natürliche Östrogene

Biosynthese und Wirkung

Im Gegensatz zu den Xenoöstrogenen wurden die natürlichen Östrogene bisher weniger einer Schätzung der Umweltgefährdung unterzogen. Sie müssen aber im Hinblick auf die Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen berücksichtigt werden (Turan, 1995). Die wichtigsten Östrogene sind 17β -Östradiol ($E2\beta$), Östron ($E1$), 17α -Östradiol ($E2\alpha$) und Östriol ($E3$) sowie bei der trächtigen Stute Equilin und Equilenin. Sie werden in den Granulosazellen der Ovarfollikel, im Corpus luteum der Primaten, in der Plazenta, in den Nebennierenrinden und im Hoden gebildet (Bamberg, 1994; Oettel, 1996). Die Biosynthese der Östrogene geht vom Cholesterol aus. Nach einigen aufeinanderfolgenden enzymatischen Reaktionen entstehen aus Cholesterol zunächst Gestagene und anschließend Androgene. Testosteron wird an der angulären Methyl-Gruppe C-19 hydroxyliert und weiter zum Aldehyd dehydriert. Unter Abspaltung von Formaldehyd wird der Ring A aromatisiert, wodurch Östradiol entsteht (Karlson et al., 1994). Wird 4-Androsten-3,17-dion aromatisiert, entsteht Östron. Östradiol und Östron können durch die 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenase ineinander umgewandelt werden. Östriol entsteht durch eine P450-abhängige Hydroxylierung in der Leber (Forth et al., 1992). $E1$, $E2$ und $E3$ haben eine Löslichkeit von 13 mg/l bei 20 °C und einen Dampfdruck von $3,0 \times 10^{-10}$ hPa ($E1$ und $E2$). Der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient liegt bei 3,43 für $E1$, bei 3,94 für $E2$ und bei 2,81 für $E3$ (Schweinfurth et al., 1996; Lai et al., 2000). Daraus ergibt sich, dass Östrogene hydrophobe organische Verbindungen sind, die nur schwache Flüchtigkeit aufweisen (Ying et al., 2002).

Von einer Frau werden ca. 8,0 bis 445,0 μg 17β -Östradiol pro Tag und von einem Mann werden ca. 6,0 bis 48,0 μg 17β -Östradiol pro Tag gebildet. Während der Schwangerschaft werden mehr Östrogene gebildet. Bei schwangeren Frauen sind es 28000 bis 37800 μg Gesamt-Östrogene pro Tag (Turan, 1995; Römbke et al., 1996). Auch bei Haustieren steigt die Östrogenproduktion während der Trächtigkeit (Hoffmann et al., 1976). Nur bei Hunden findet keine graviditätsbedingte Östrogenproduktion statt (Hoffmann, 1994).

Östrogene werden mit Hilfe von Transportproteinen (z. B. Albumin) zur Zelle befördert. Man nimmt an, dass Östrogene durch Diffusion in die Zelle gelangen. Dort binden sie sich an Östrogenrezeptoren, die dadurch aktiviert werden. Daraufhin wandert der Östrogen-

Rezeptor-Komplex in den Zellkern. Der Rezeptor bindet an bestimmte DNA-Sequenzen. Diese sind am Promotor des Zielgens lokalisiert und werden „hormon-response elements“ genannt. Durch das Binden an das „hormon-response element“ wird die Transkription von Zielgenen reguliert (Jungbauer und Graumann, 1998). Es werden drei Östrogenrezeptoren unterschieden: ER α , ER β und ER γ (Kuiper et al., 1996; Hawkins et al., 2000). Sie gehören zur großen Familie der Proteine, die als „ligand-activated transcription factors“ bezeichnet werden. Die Rezeptortypen sind in den verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilt. Außerdem können Substanzen, die bei einem Rezeptortyp als Agonist wirken, beim anderen Rezeptortyp als Antagonist wirken. Der Rezeptor weist verschiedene Bindungsdomänen auf und diese können unterschiedliche Gene aktivieren (Gustafsson, 2000 a, b; Katzenellenbogen et al., 2000).

Östrogene steuern im Körper eine Vielzahl von Vorgängen, die sich sowohl auf die weiblichen Geschlechtsmerkmale einschließlich des Sexualverhaltens als auch auf den Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, das Skelett, das Herz- Kreislaufsystem, die Haut und das Immunsystem beziehen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass einen großen Teil der biologischen Effekte die Wechselwirkungen zwischen Östrogenen und Gestagenen darstellen (Oettel, 1996). Hormone wirken in geringen Dosen, der Übergang von physiologischen zu krankmachenden Dosen ist fließend (Jungbauer und Graumann, 1998).

Inaktivierung und Ausscheidung

Östrogene werden im Körper metabolisiert und anschließend ausgeschieden. Die Metabolisierung erfolgt vor allem in der Leber, aber auch in der Niere, der Lunge, den Gonaden, im Blut und in anderen Geweben. Es kann Oxidation, Hydroxylation, Deoxidation und Methylierung erfolgen, bevor die Moleküle unter Erhaltung des Ringsystems mit Schwefelsäure verestert oder mit Glucuronsäure glycosidisch verbunden und damit inaktiviert werden. Die lipophilen Östrogene werden dadurch in besser wasserlösliche Konjugate umgewandelt, die in den Harn und mit der Galle in den Darm gelangen (Lauritzen, 1988; Bamberg, 1994; Mutschler, 1996). Ein großer Teil der Östrogenkonjugate wird im Darm von der intestinalen Flora hydrolysiert, so dass die nun wieder freien Östrogene ausgeschieden oder teilweise rückresorbiert werden (Hoffmann und Evers, 1986). Die tägliche Ausscheidung von Östrogenen ist abhängig von Alter, Geschlecht, Zyklus und Reproduktionsphase. Die Produktion von Östrogenen entspricht nicht unbedingt der Ausscheidung (Lange et al., 2002). Die Speziesunterschiede im Steroidstoffwechsel drücken sich insbesondere in der quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Ausscheidung der Metabolite in Harn und Kot aus (Bamberg, 1994). So wird beim Menschen der größte Teil der Östrogene mit dem Harn ausgeschieden, wobei schwangere Frauen mit 6859 μg Östrogenen pro Tag die höchsten

Werte erreichen (Fotsis et al. 1980). Frauen in der Menopause scheiden ca. 7,3 µg und Männer ca. 7 µg Östrogen pro Tag mit dem Harn aus (Fotsis und Adlercreutz, 1987). Bei Rindern und Schafen wird der größte Teil (etwa 90 %) der Östrogene in Form des 17 α -Östradiols mit dem Kot (unkonjugiert) abgegeben. Die restlichen 10 % der Östrogene werden mit dem Harn ausgeschieden. Davon ist bei Rindern etwa ein Drittel konjugiert, es handelt sich hauptsächlich um sulfatiertes Östron (Monk et al., 1974; Möstel et al., 1983; Hoffmann, 1994; Karg, 1994). Pferde und Schweine scheiden vor allem Östron und 17 β -Östradiol aus (Choi, 1987; Czekala et al., 1992). Die vermehrte Produktion und Ausscheidung von Östrogenen insbesondere im Verlauf des letzten Drittels der Gravidität ist seit langem bekannt und für zahlreiche Tierarten beschrieben worden (Hoffmann, 1994). Bei Kühen steigen die Östrogenwerte im Harn von ca. 3,6 µg/5 ml Harn im 7. Graviditätsmonat, ca. 5,4 µg/5 ml Harn im 8. Graviditätsmonat, ca. 11,2 µg/5 ml Harn im 9. Graviditätsmonat und bis auf ca. 20,3 µg/5 ml Harn zur Geburt an (Grunert und Ahlers, 1969). Hauptmetabolit im Harn von trächtigen Kühen ist sulfatiertes Östron gefolgt von glucuronidiertem 17 α -Östradiol, glucuronidiertem Östron und glucuronidiertem 17 β -Östradiol (Goes de Pinho, 1995). Im Kot von trächtigen Kühen ist 17 α -Östradiol mit 56,7 % am stärksten vertreten, es folgen 17 β -Östradiol mit 32,0 % und Östron mit 11,3 % (Hoffmann et al., 1997). Bei Schafen befinden sich 17 α -Östradiol zu 80 %, Östron zu 15 % und 17 β -Östradiol zu 5 % im Kot (Bursch und Bamberg, 1990). Bei nicht trächtigen Ziegen enthält der Kot durchschnittlich ca. 0,01 µg/g Östrogene, wobei Östron mit 40 %, 17 β -Östradiol mit 35 % und 17 α -Östradiol mit 25 % vertreten sind (Bamberg et al., 1986). Bei Schweinen steigt die Konzentration von freiem Östron im Kot zwischen dem 24. und 30. Trächtigkeitstag auf über 0,013 µg/g an. Nach der 5. bis zur 10. Woche fallen die Östrogenkonzentrationen auf Basiswerte ab, erst danach steigen sie wieder an und sind bis zur Geburt erhöht. Bei trächtigen Pferden liegt die prozentuale Verteilung der Östrogenfraktionen im Kot bei 50 % Östron, 40 % 17 β -Östradiol und 10 % 17 α -Östradiol. Ab der 15. Trächtigkeitswoche steigt die Östrogenkonzentration von 0,015 µg/g bis zur 31. Woche auf 0,20 µg/g an und sinkt dann unterschiedlich stark wieder ab (Karg, 1994). Neben den endogen produzierten Östrogenen werden auch therapeutisch oder prophylaktisch eingesetzte Östrogene ausgeschieden (Panter et al., 1999).

2.3 Gefährdungen von Lebewesen durch Östrogene und östrogen wirksame Substanzen

Die biologische Wirksamkeit von Xenoöstrogenen ist 1.000- bis 1.000.000-fach geringer als von natürlichen Östrogenen (Fürhacker, 1998). Phytoöstrogene liegen in ihrer biologischen Wirksamkeit zwischen den natürlichen Östrogenen und den Xenoöstrogenen. Sie sind 2- bis 5-fach schwächer wirksam als 17β -Östradiol, aber durch die hohe Konzentration in einigen Pflanzen und der langsameren Metabolisierung können Gewebespiegel erreicht werden, die 1000-fach höher sind als die von endogenen Östrogenen (Metzler und Pfeiffer, 2001). Einige synthetische Östrogene können noch stärker wirksam sein als natürliche Östrogene. So ist das Wirkungspotential von 17α -Ethinylöstradiol etwa viermal höher als von 17β -Östradiol (Kalbfus, 1998).

Endokrine Disruptoren können während der Embryonalentwicklung und während des ganzen Lebens Effekte auf den Körper ausüben (Crisp et al., 1998). Dabei können die endokrinen Disruptoren, die an Östrogenrezeptoren binden, östrogene Wirkungen hervorrufen oder die Rezeptoren für endogene Hormone blockieren (McLachlan, 1993; Sonnenschein und Soto, 1998). Treten die Einflüsse in kritischen Entwicklungsphasen auf, sind sie permanent und irreversibel (Colborn et al., 1993). So kann die Morphologie und Funktion von allen Organen des Fötus betroffen sein, die Rezeptoren für Sexualhormone besitzen, wie die Geschlechtsorgane, das Gehirn, das Skelett, die Schilddrüse, die Leber, die Nieren und das Immunsystem (Colby, 1980; McEwan, 1981; Leatherland und Sonstegard, 1982; Grossman, 1984; Saal et al., 1997; Stoker et al., 1999). Außerdem kann das Verhalten beeinflusst werden (Lange et al., 2002; Colborn, 2004). Endokrine Disruptoren mit östrogenen Wirkung können nachteilige Effekte bei Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren - und damit auch beim Menschen - auslösen, da Steroidhormone und die Hormonrezeptoren in der Evolution kaum Veränderung erfahren haben (Lange et al., 2003). Bei Invertebraten ist ein Östrogenrezeptor noch nicht nachgewiesen (Lange et al., 2003) und über Schadwirkungen ist nicht viel bekannt (Karbe et al., 1997). Flohkrebse wurden im Versuch durch Östrogene geschädigt (Vandenbergh et al., 2003) und bei Populationen der Purpurschnecke in der Nordsee ist ein androgener Effekt durch das Antibewuchsmittel Tributylzinn (TBT) auf Schiffsrümpfen beschrieben worden. Die weiblichen Schnecken entwickeln einen Penis (Imposex-Phänomen). Die Eiablage ist praktisch unmöglich geworden (Bryan et al., 1987).

Bei Alligatoren in stark belasteten Seen in Florida werden vielfältige Veränderungen des Hormonspiegels und der Geschlechtsorgane beobachtet (Guillette et al., 1994).

Es wurde bewiesen, dass Fische unterhalb von Klärwerksabflüssen stark erhöhte Vitellogeninspiegel (s. 2.4) und andere Veränderungen, wie Hermaphroditismus aufweisen

(Sumpter, 1998; Jobling et al., 1998; Tilton et al., 2002). Diese Beobachtungen wurden mit Fischen, die in Käfigen unterhalb von Klärwerksabflüssen gehalten wurden (Harries et al., 1996; Larsson et al., 1999; Rodgers-Gray et al., 2000) und bei in-vivo-Versuchen mit Süß- und Salzwasserfischen bestätigt (Gimeno et al., 1996; Routledge et al., 1998; Harries et al., 1999; Miles- Richardson et al., 1999; Folmer et al., 2000; Bjerselius et al., 2001; Aerle et al., 2002; Hill und Janz, 2003; Robinson et al., 2003;). Die Konzentration von Östrogenen und Xenoöstrogenen war im Wasser gering aber ausreichend, um derartige Veränderungen zu bewirken (Jobling et al., 1998; Huang und Sedlak, 2001). Fische in frühen Entwicklungsstadien können noch empfindlicher auf östrogen wirksame endokrine Disruptoren reagieren (Gimeno et al., 1996). Petrovic et al. (2002) beschrieben auch das Auftreten von Störungen bei Fischen, wobei vor allem Östron im Wasser gefunden wurde. Der Anstieg von Vitellogenin erfolgt exponentiell zur Dosis und Zeit (Larsson et al., 1999). Bei Vögeln kann die Entwicklung von Reproduktionsorganen und des Gehirns durch Östrogene und Xenoöstrogene gestört werden (Brunström et al., 2003).

Es besteht die Vermutung, dass auch Menschen durch endokrine Disruptoren mit östrogenener Wirkung geschädigt werden (Shape und Skakkebaek, 1993; McLachlan, 2001). Föten können während der Schwangerschaft endokrinen Disruptoren ausgesetzt sein. Foster et al. (2002) fanden in der Amnionflüssigkeit während der 14. bis 21. Woche Xenoöstrogene (in 25 % aller Fälle) und Phytoöstrogene (in 96,2 % aller Fälle). Bei Männern wurde ein Rückgang der Spermienkonzentration und des Samenvolumens in den letzten 50 Jahren beobachtet (Carlsen et al., 1992). Studien von Comhaire et al. (1996) zeigten eine Abnahme der Spermienmotilität und eine Zunahme der abnormen Spermienmorphologie. Außerdem häufen sich Fälle von Hodenkrebs, Hodenhochstand und Harnröhrensplattung (Forman und Møller, 1994; Toppäri et al., 1996). Bei Frauen wurde ein Anstieg der Brust- und Uteruskrebsrate mit östrogen wirksamen endokrinen Disruptoren in Verbindung gebracht (Mussalo-Rauhamaa et al., 1990; Falc et al. 1992; Wolff et al. 1993; Dewailly et al. 1994; Hunter et al., 1997).

Die vorliegenden epidemiologischen Daten, die eine Korrelation zwischen der vermehrten Freisetzung von endokrinen Disruptoren in die Umwelt und einer Zunahme bestimmter Erkrankungen aufzeigen, sind allerdings nicht geeignet, einen kausalen Zusammenhang sicher zu belegen (Bursch und Schulte-Hermann, 1998), da die Daten z.T. sehr widersprüchlich sind und unterschiedliche oder ungeeignete Untersuchungsverfahren und statistischen Methoden angewendet wurden (Safe, 1995; Feldman, 1997; Jouannet et al., 2001; Sasco, 2001). Nach Juberg (2000) existieren keine epidemiologischen Daten, die einen Zusammenhang zwischen endokrinen Disruptoren und negativen Effekten bei Menschen sicher stützen. Obwohl der gegenwärtige Stand der Kenntnis noch keine abschließende Bewertung erlaubt, zeichnet sich doch ab, dass die Bedeutung von Xeno-

östrogenen für die menschliche Gesundheit aus folgenden zwei Gründen eher gering ist. Sowohl die Wirkungsstärke als auch die Konzentration der Stoffe ist um Größenordnungen niedriger als z. B. die der körpereigenen Östrogene (Greim, 1998). Allerdings ist die synergistische Wirkung von Östrogenen und Xenoöstrogenen zu beachten.

Östrogene, die von Tieren ausgeschieden werden, können schädlich auf andere Tiere wirken. Einige Fälle sind beschrieben worden. So bekamen Färsen Fortpflanzungsstörungen, die auf Einstreu gehalten wurden, auf dem zuvor hochtragende Stuten standen (Watkins, 1995). Hühnerkot, der siliert an Färsen verfüttert wurde, führte zu Hyperöstrogenismus (Euterwachstum und Laktation) (Shore et al., 1988). Außerdem konnte Wasser, welches von Viehweiden in Seen und Flüsse gespült wurde, bei Fischen und Schildkröten das endokrine System und das Reproduktionssystem stören (Irwin et al., 2001; Orlando et al., 2004).

Östrogene und besonders Xenoöstrogene können in Organismen akkumuliert werden. Bioakkumulation ist ein Prozess, bei dem die Konzentration einer Substanz in einem Organismus einen Level erreicht, der höher ist als außerhalb des Organismus. Die Substanz kann z. B. über die Nahrung, über die respiratorische Oberfläche oder über dermale Adsorption in den Organismus gelangen (Gobas, 2001). Natürliche Östrogene und Xenoöstrogene sammeln sich in der Galle von Fischen an, wenn das Gewässer mit diesen Substanzen belastet ist. Die Konzentration in der Galle wird um so höher, je länger die Fische diesem Wasser ausgesetzt sind. Es wurden Werte erreicht, die 10^4 - bis 10^6 -fach höher waren als im Wasser. Das beweist, dass der Kontakt zu verschiedenen Östrogenen in der Umwelt zur Bioakkumulation führen kann (Larsson et al., 1999). Im Serum von Fischen aus belasteten Gewässern wurden 13- bis 16-fach erhöhte Östradiolwerte gemessen (Tilton et al., 2002).

Die Akkumulation kann zu einer Anreicherung in der Nahrungskette führen, was vor allem für die Endkonsumenten ein Risiko darstellt (Jouany, 2000). Als Beispiel für eine Anreicherung über die Nahrungskette soll Polyvenylchlorid (PCB), ein Xenoöstrogen, herangezogen werden: Im Ontariosee ist die PCB-Konzentration im Phytoplankton gegenüber derjenigen in der Wassersäule um 250-fach höher, im Zooplankton um 500-fach, im Wasserfloh um 45.000-fach, im Stint um 835.000-fach, in der Seeforelle um 2,8-millionenfach und in der Silbermöve um 25-millionenfach höher. Im Körperfett von Eisbären wurden sogar Werte gefunden, die um 3-milliardenfach höher liegen als im Wasser (Colborn et al., 1996). Auch Muscheln, die in östrogenhaltigen Flussmündungen leben, reichern Östrogene im Körper an. Wenn männliche Flundern diese Muscheln fressen, entwickeln die Flundern hohe Vitellogeninspiegel (Matthiessen, 2001). Nach den Berechnungen von Remesar et al. (1999) nimmt ein Mensch ca. $1 \mu\text{mol}$ Östron pro Tag mit der Nahrung auf. Östrogene sind in allen Nahrungsmittel vorhanden, die tierischen Ursprungs sind. Die Konzentration ist von der Art

des Nahrungsmittels und der Tierart abhängig (Daxenberger et al., 2001). Außer im Fettgewebe sammeln sich verschiedene Xenoöstrogene auch in der Muttermilch an. Kinder, die mit Muttermilch ernährt werden, sind in dieser Zeit oft höheren Konzentrationen dieser Substanzen ausgesetzt, als zu jedem anderen Zeitpunkt in ihrem Leben (Jensen und Slorach, 1991; Thomas und Colborn, 1992).

2.4 Testung der biologischen Wirksamkeit

Allen und Doisy (1923) sowie Bülbring (1935) entwickelten in-vivo-Methoden in erster Linie als Graviditätstest. Weiterhin existieren Tests mit Vögeln als Bioindikatoren (Gülden et al., 1997). In neuerer Zeit werden Fische als Bioindikatoren eingesetzt, um östrogen wirksame Substanzen aufzuspüren. Sind solche Substanzen vorhanden, induzieren sie bei männlichen Fischen die Synthese von Vitellogenin, einer Vorläufersubstanz von Dotterproteinen, die normalerweise nur von weiblichen Fischen produziert wird (Reisner-Oberlehner, 1998). Der Test ist besonders für Screening-Programme geeignet (Bursch und Schulte-Hermann, 1998).

Aus der Sicht des Tierschutzes sind zahlreiche zellbiologische in-vitro-Methoden besser geeignet, um östrogene Wirkungen und Wirkmechanismen zu untersuchen. Die Bindung an intrazelluläre Östrogenrezeptoren ist eine Voraussetzung für die Wirkung von Östrogenen auf ihre Zielzelle im Organismus (Gülden et al., 1997; Zacharewski, 1997). So werden östrogen sensitive Brustkrebszelllinien verwendet (MCF-7-, ZR-75-1, T47D-Zellen), bei denen Zellvermehrung, Zellwachstum oder die Synthese von bestimmten Proteinen bewertet werden (Dankwardt, 1998). Soto et al. (1995) entwickelten aus MCF-7 Zellen einen E(strogen)-screen zur Erfassung der östrogenen Aktivität von Substanzen. Mit einem weiter entwickelten E-screen konnten Körner et al. (1999, 2000) die Zu- und Abflussbalance von östrogen aktiven Verbindungen in einem Klärwerk analysieren.

Als weiterer in-vitro-Test zur Feststellung östrogenen Wirkungen werden Reporter-Plasmid-Assays eingesetzt. Dabei handelt es sich um Hefezellen, in deren Erbgut erstens ein Plasmid mit der Information für den menschlichen Östrogenrezeptor und zweitens ein „Reporter“-Gen, z. B. ein Plasmid für ein farbstoff-umsetzendes Enzym, gentechnisch eingefügt werden. Als Maß für die östrogene Wirkung einer Testsubstanz dient die Aktivierung des Östrogenrezeptors, die aufgrund der Synthese des Reporter-Enzyms und der damit verknüpften Farbänderung der Hefezellkultur erkannt wird (Bursch und Schulte-Hermann, 1998). Desbrow et al. (1998) verwendeten den Hefezell-Bioassay, um Proben aus einem Klärwerksabfluss auf östrogene Aktivität zu prüfen, da der Test sowohl Östrogene als auch alle bekannten Xenoöstrogene anzeigt. Die Nachweisgrenzen liegen für 17 β -Östradiol bei 0,01 μ g/l und für Östron bei 2 μ g/l (Wegener et al., 1999). Die Empfindlichkeit von genetisch veränderten Hefezellen ist doppelt so hoch wie die Empfindlichkeit von MCF-7-

Zellen und fünf mal so hoch wie die eines Uterus-Bioassay. Der Reporter-Plasmid-Assay ist besonders geeignet, um östrogen wirksame Verbindungen zu finden und um Gefahren für Menschen und die Umwelt einzuschätzen (Coldham et al., 1997). Nach Folmer et al. (2002) ist der Hefezell-Bioassay und der Test mit MCF-7-Zellen bis zu 1000-fach weniger empfindlich als der Vitellogenin-Assay bei männlichen Zahnkarpfen (*Cyprinodon variegatus*), so dass bei in-vitro basierten Screening-Programmen falsche negative Ergebnisse zu befürchten sind. Ackermann et al. (2002) entwickelten ein Fisch-Reporter-Gen Assay, mit dem eine realistische Einschätzung von Gefahren durch östrogen wirksame Verbindungen für Fische möglich ist.

2.5 Identifizierung und Quantifizierung von Östrogenen und östrogen wirksamen Substanzen

Wenn in einer Umweltprobe durch Bioassays östrogene Aktivität nachgewiesen wurde, müssen die Substanzen, die diese Wirkung hervorrufen, identifiziert und quantifiziert werden. Dieses Vorgehen wird als „toxicity identification and evaluation (TIE) approach“ bezeichnet (Sumpter 1998; Desbrow et al., 1998). Es werden hauptsächlich zwei Untersuchungsprinzipien zur Identifizierung und Quantifizierung eingesetzt: der Immunoassay (Enzymimmunoassay und Radioimmunoassay) und verschiedene Varianten der Chromatographie. Durch Kopplung von Steroiden (Haptene) an Proteine war es möglich, Antikörper gegen Steroidhormone zu erzeugen und sie zum quantitativen Nachweis einzusetzen. Damit konnten niedrige Hormonmengen (ng bis pg) in kleinen Probenvolumina analysiert werden (Choi, 1987). Der Enzymimmunoassay bietet verschiedene Vorteile. Hormone können im aquatischen Milieu bestimmt werden (Schmid und Frühauf, 1998), wobei die Probe nicht vorbereitet werden muss (Knopp et al., 1999). Die Kosten sind nicht hoch, die Untersuchung geht schnell, relativ einfach und es kann manuell oder automatisch gearbeitet werden. Dabei ist der Enzymimmunoassay extrem sensibel. Natürliches organisches Material kann jedoch die Untersuchung stören (Ghoneim, 1989; Huang und Sedlak, 2001). In diesem Fall muss die Probe vor der Untersuchung filtriert und verdünnt werden (Knopp et al., 1999). Der Radioimmunoassay ist teurer und aufwendiger, aber genauso sensibel wie der Enzymimmunoassay (Ghoneim, 1989).

Die Chromatographie wird in vielen verschiedenen Variationen eingesetzt (Desbrow et al., 1998; Kuch und Ballschmiter, 2000; Johnson et al., 2000; Körner et al., 2000; Kolpin et al., 2002). Der Einsatz ist in der Routineanalyse möglich (Belfroid et al., 1999), allerdings liegt das Detektionslimit oft zu hoch. Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits können jedoch schon endokrine Wirkungen hervorrufen (Huang und Sedlak, 2001). In verschmutzten Proben ist die Wiederfindungsrate sehr schlecht (Schmid und Frühauf,

1998). Zudem ist diese Methode teuer und aufwendig, so dass der Enzymimmunoassay bevorzugt wird (Sedlak et al., 2000).

2.6 Eintrag von Östrogenen in die aquatische Umwelt

Die Östrogene gelangen durch menschliche und tierische Ausscheidungen in die Umwelt. Rechnerisch ergibt sich eine Ausscheidung von ca. 250 Tonnen Östrogenen pro Jahr durch die Weltbevölkerung (Routledge et al., 1999). Der größte Teil der menschlichen Ausscheidungen gelangt in modernen Industrieländern über das Abwassersystem ins Klärwerk. Während dieses Transports kann Abwasser austreten (Leckagen) und in die Umwelt gelangen (Ternes et al., 1999 a). Im Klärwerk erfolgt keine vollständige Entfernung der Hormone, so dass ein Eintrag in das nachfolgende Gewässer stattfindet. Hier liegt die größte Quelle von natürlichen und synthetischen Östrogenen in der aquatischen Umwelt (Baronti et al., 2000). Die rezyklierte Menge des Wassers kann in Zeiten von wenig Regen bis zu 90 % betragen (Routledge et al., 1998). Das Aufbringen von Klärschlamm auf landwirtschaftliche Nutzflächen ist eine weitere potenzielle Kontaminationsquelle für Boden und Grundwasser (Ternes et al., 1999 a). Über die Östrogenkonzentrationen im Klärschlamm sind kaum Daten vorhanden, so dass über deren Wirkung zur Zeit noch keine Aussage getroffen werden kann (Fürhacker, 1998). Es muss aber die Gefahr der Akkumulation berücksichtigt werden (Larsson et al., 1999).

Auch landwirtschaftliche Nutztiere tragen zu einer Belastung der Umwelt durch Östrogene bei, egal welcher Art sie angehören oder welches Geschlecht sie haben (Knight, 1979; Hanselman et al., 2003). Berechnungen ergaben, dass von Rindern, Schweinen, Schafen und Hühnern 82 Tonnen Östrogene pro Jahr in den USA und Europa ausgeschieden werden (Tabelle 1). Bezogen auf den Kuhbestand werden in Deutschland pro Jahr etwa 3,8 Tonnen Östrogene mit dem Kot ausgeschieden (Möstl et al., 1997; Schlenker et al., 1999 a). Die Ausscheidungen gelangen nicht in das Abwasser, sondern direkt in die Umwelt, bei Weidehaltung als Kot und Harn und bei Stallhaltung nach einer Lagerung als Dung oder Gülle (Schlenker et al., 1999 b). Einige Versuche demonstrieren die Abhängigkeit der Stabilität der Östrogene in den Exkrementen von der Struktur, der Matrix, der Temperatur, den Lichtverhältnissen und der Sauerstoffverfügung (Lange et al., 2002; Neumann et al., 2002). In den Versuchen von Schlenker et al. (1999 b) nahm die Konzentration von Östrogenen in Kotproben während einer 13-wöchigen Lagerung von 296 ng/g Kot auf 64,0 ng/g Kot bei 5 °C bzw. auf 8,30 ng/g Kot bei 30 °C ab. Werden die Exkremente auf landwirtschaftliche Flächen verteilt, wird ein Teil der Östrogene im Boden adsorbiert und der Rest wird von Regenwasser ausgewaschen und weitertransportiert (Runoff) und kann auch ins Grundwasser gelangen (Lange et al., 2002). Irwin et al. (2001) fanden in Teichen, die in der Nähe von Weiden für Rinder lagen, erhöhte 17 β -Östradiolwerte (Tabelle 3). Peterson et

al. (2000) konnten zeigen, dass die Östrogene, die mit den Ausscheidungen von Geflügel und Rindern in den Karstboden gelangt sind, das Grundwasser erreicht haben. Durch Uferfiltration können Östrogene aus Oberflächengewässern ins Grundwasser gelangen (Ternes et al., 1999 a). Im Meer kommen ebenfalls Östrogene durch Auswaschung von belasteten Feldern vor. Die Östrogenkonzentration im Meer ist in der Nähe von Abwasserquellen am höchsten (Atkinson et al., 2003).

Tabelle 1: Errechnete jährliche Östrogenausscheidung von Farmtieren in der EU und in den USA im Jahr 2000 (nach Lange et al., 2002)

Tier	Östrogene [mg/Jahr]	EU		USA	
		Anzahl der Tiere [Millionen]	Östrogene [t/Jahr]	Anzahl der Tiere [Millionen]	Östrogene [t/Jahr]
Rinder		82	26	98	45
Kälber	16	24	0,38	17	0,27
Kühe	110	29	3,2	20	2,2
Kühe (trächtig)	990	21	21	43	43
Zuchtstiere				17	
Bullen	200	7,8	1,6	2,3	0,46
Schweine		122	3	59	0,83
Ferkel		63		51	
Sauen	43	27	1,2		
Sauen (trächtig)	70	8,6	0,6	5,7	0,4
Eber		22			
Wildschweine	830	1,5	1,2	0,52	0,43
Schafe	8,4	112	1,3	7,7	0,092
Lämmer		40		2,5	
Schafe (trächtig)	19	68	1,3	4,6	0,087
Böcke	9,1	2,8	0,025	0,58	0,005
Hühner		1002	2,8	1816	2,7
Masthühner	0,34	227	0,077	691	0,23
Masthähne	0,078	227	0,016	691	0,048
Legehühner	7,1	380	2,7	332	2,4
Gesamt		1318	33	1978,4	49

2.7 Vorkommen von Östrogenen in der aquatischen Umwelt

Östrogene wurden in Kläranlagenabläufen, Oberflächenwasser, Grundwasser und Trinkwasser gefunden (Kalbfus, 1998).

2.7.1 Abwasser

Kommunale Abwässer gelangen ins Klärwerk und werden dort gereinigt. Anschließend wird das geklärte Wasser in Flüsse eingeleitet, wo noch vorhandene Schadstoffe auf die im Wasser lebenden Organismen wirken können, aber auch eine Verdünnung und ein weiterer Abbau erfolgt. Messungen der Östrogenkonzentration im Ablauf von Klärwerken wurden in verschiedenen Ländern durchgeführt. Die Angaben für Östron (E1) reichen im Ablauf von Klärwerken bis zu 80 ng/l und für 17 β -Östradiol (E2) bis zu 50 ng/l (Tabelle 2).

Tabelle 2: Östron- (E1) und 17 β -Östradiolkonzentrationen (E2) in Abläufen von verschiedenen Klärwerken

E1 im Abfluss von Kläranlagen [ng/l]	E2 im Abfluss von Kläranlagen [ng/l]	Literaturstelle
	max 21	Stumpf et al., 1996
9,3	1,0	Baronti et al., 2000
3 bis 9	max 6	Ternes et al., 1999 a
4,5	0,9	Belfroid et al., 1999
5,8	1,1	Larsson et al., 1999
1 bis 80	1 bis 50	Desbrow et al., 1998
	max 4,05	Huang, Sedlak, 2001
< 0,4 bis 54	< 0,4 bis 12	Johnson et al., 2000
< 2,5 bis 8,1	< 5 bis 7,6	Petrovic et al., 2002
0,3 bis 18	0,2 bis 0,6	Kalbfus, 1998
	nm-3,66	Snyder et al., 1999
max 76	nm	Wegener et al., 1999

nm: nicht messbar

Shore et al. (1993) verglichen die Östrogenkonzentrationen in verschiedenen Klärwerksabflüssen in Israel. Stammte das Abwasser aus Gebieten mit Farmen, war die Östrogenkonzentration wesentlich höher im Vergleich zu Abwässern aus städtischen Gebieten. In beiden Fällen war die Östrogenkonzentration im Sommer mehr als doppelt so hoch wie im Winter.

2.7.2 Oberflächenwasser

In verschiedenen Ländern wurden Östrogene im Oberflächenwasser nachgewiesen. Für Östron und 17 β -Östradiol sind Werte bis zu 20,1 ng/l bzw. 29,1 ng/l beschrieben worden (Tabelle 3). Im Sommer kann die Hormonkonzentration im Vorfluter um den Faktor 5 bis 10 erhöht sein, da die gleiche Hormonmenge mit weniger Flusswasser verdünnt wird (Williams et al., 1999). Im Ozean werden Konzentrationen bis zu 2,0 ng/l gemessen (Atkinson et al., 2003).

Tabelle 3: Östron- (E1) und 17 β -Östradiolkonzentrationen (E2) in verschiedenen Oberflächengewässern

E1 [ng/l]	E2 [ng/l]	Ort	Art des Gewässers	positive Befunde	Literaturstelle
< 1-20,1	< 1-29,1	Deutschland	Oberflächengewässer		Wenzel et al., 1998
max 6,0	neg	Deutschland	Fluss, See	E1: 2 von 14	Wegener et al., 1999
max 1,6	neg	Deutschland	Fluss	E1: 3 von 15	Ternes et al., 1999 a
max 2,5	max 4,5	Deutschland	Oberflächengewässer	E1: 13 von 40 E2: 13 von 40	Kalbfus, 1998
max 3,4	max 5,5	Niederlande	Fluss, Kanal, Küste	E1: 7 von 11 E2: 4 von 11	Belfroid et al., 1999
8,0	neg	Spanien	Fluss		Petrovic et al., 2002
	max 1,8	USA	Teich (Viehweide)		Irwin et al., 2001
	max 0,78	USA	Teich (nahe Viehweide)		
	max 0,24	USA	Teich (Botanischer Garten)		
	< 1	USA	Fluss		Huang und Sedlak, 2001
	max 2,67	USA	See	E2: 2 von 6	Snyder et al., 1999
	max 1,28	USA	Kanal	E2: 6 von 8	

Östrogene können von Sedimenten adsorbiert werden. In oberflächennahen Schichten des Sediments ist eine Biodegradation möglich (Jürgens et al., 2002). Unter anaeroben Bedingungen findet eine Akkumulation statt. Die Östrogene können dann über einen längeren Zeitraum auf Wasserpflanzen einwirken und von diesen aufgenommen werden. Über Desorption werden adsorbierte Östrogene wieder in die Wassersäule freigesetzt (Williams et al., 1999). Oh et al. (2000) bestimmten eine östrogene Aktivität von 3,39 bis 10 pg/g im Sediment. Petrovic et al. (2000) fanden im Sediment 11,8 μ g/kg Östron, aber kein 17 β -Östradiol.

Die Konzentrationen von Östrogenen im freien Wasser und im Sediment müssen nicht in Korrelation stehen. Die Verteilung zwischen beiden Kompartimenten ist in jedem Fluss unterschiedlich und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Williams et al. (1999) fanden 17 β -Östradiol zu 47 % im Wasser und zu 53 % im Sediment und Östron zu 35 % im Wasser und zu 65 % im Sediment. Die jahreszeitliche Variation der Regenmenge und Durchflussrate beeinflussen die Adsorption von Östrogenen an das Sediment (Petrovic et al., 2000). In den Versuchen von Lai et al. (2000) erfolgte in den ersten 30 Minuten eine schnelle Adsorption von Östrogenen an das Sediment, dann wurde die Adsorptionsgeschwindigkeit langsamer, da vermutlich die Bindungsstellen im Sediment zunehmend besetzt waren. Nach ca. 60 Minuten wurden die Östrogene langsam wieder freigesetzt. Sind Substanzen in der Lösung, die um die freien Bindungsstellen konkurrieren, wird die Adsorption gehemmt. Die Adsorption von Östrogenen konnte durch mehr Sediment, organischen Kohlenstoff und höheren Salzgehalt verstärkt werden (Lai et al., 2000).

2.7.3 Grundwasser und Trinkwasser

Östrogene erreichen unter anderem durch Auswaschung aus landwirtschaftlichen Feldern und Dunglagerstätten das Grundwasser (Peterson et al., 2000). Von Shore et al. (1995) wurden 5 ng/l und von Peterson et al. (2000) 6 bis 66 ng/l Östron gemessen. Kalbfus (1998) fand in drei von sieben Grundwasserproben Östron (0,2 ng/l). 17 β -Östradiol konnte nicht gefunden werden.

Besonders dort, wo zur Trinkwassergewinnung Oberflächenwasser oder durch Oberflächenwasser beeinflusstes Grundwasser verwendet wird, sind Trinkwasserkontaminationen möglich. Die Konzentration ist infolge Verdünnung, Adsorption und Abbau gering (Schmidt und Brockmeyer, 2000). Shore et al. (1993) beobachteten, dass Östrogene bei extremer Trockenheit Werte von 0,05 bis 0,08 nmol/l in einem See, der zur Trinkwassergewinnung verwendet wird, erreichen. Nach starken Regenfällen nimmt die Östrogenkonzentration wieder ab. Rurainski et al. (1977) fanden in ca. 50 süddeutschen Quellen und Brunnen Östradiol in verschiedenen Tiefen (Mittelwert: 0,12 bis 0,42 ng/l, maximal 0,94 ng/l). In einigen Trinkwasserproben aus Süddeutschland haben Kuch und Ballschmiter (2000) bis zu 0,7 ng/l Östrogene gemessen. Kalbfus (1998) untersuchte 15 Trinkwasserproben und fand in zwei Proben Östron (0,2 bis 0,8 ng/l) und in einer Probe 17 β -Östradiol (0,2 ng/l). Im Trinkwasser wurden von Stumpf et al. (1996) sowie Schmid und Frühauf (1998) keine Östrogene gefunden.

2.8 Eliminierung von Östrogenen in der aquatischen Umwelt

Der Abbau von Östrogenen in der aquatischen Umwelt wird durch Biodegradation und durch physikalische Prozesse bestimmt. Biodegradation ist ein Abbau von Substanzen durch Mikroorganismen oder deren Enzyme (Agteren et al., 1998). Neben Biodegradation kann die Eliminierung von Östrogenen aus dem Wasser auch durch Photodegradation und Verdunstung sowie Adsorption erfolgen (Jürgens et al., 2002).

Photodegradation von 17β -Östradiol ist im Vergleich zur Biodegradation sehr langsam und kein wichtiger Mechanismus zur Eliminierung von Östrogenen aus dem Flusswasser (Jürgens et al., 2002). Die Konzentration der Östrogene, der pH-Wert und die Art der Bestrahlung beeinflussen die Photodegradation (Liu und Liu, 2004). Die Entfernung von Östrogenen aus dem Oberflächenwasser über die Verdunstung ist gering, da 17β -Östradiol und Östron geringe Dampfdruckwerte von $3,0 \times 10^{-10}$ hPa haben (Schweinfurth et al., 1996). Da der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient sehr hoch ist, sind Östrogene stark hydrophob bzw. lipophil, so dass eine Tendenz zur Adsorption an Partikel besteht (Huang und Sedlak, 2001). Nach Sedlak et al. (2000) sind bis zu 90 % der Östrogene an organische Stoffe gebunden und werden so aus dem Klärwasser entfernt. Jedoch war bei den Untersuchungen von Layton et al. (2000) die Adsorption nicht der entscheidende Faktor. Fühacker et al. (1999) testeten mit radiomarkiertem 17β -Östradiol die Adsorptionsneigung im Abwasser. Der allergrößte Teil des Hormons verblieb in der wässrigen Phase, nur 3 % haben sich an andere abfiltrierbare Stoffe gebunden.

2.8.1 Biodegradation im Abwasser

Von einigen Autoren werden die Östrogenkonzentrationen auch im Klärwerkszulauf gemessen. So kann die prozentuale Reduktion berechnet werden. Shore et al. (1993) geben die größte Spannweite mit einer Reduktionsrate zwischen 20 bis 88 % an. Erst nach einer dreimonatigen Reinigung des Abwassers in einem Sandfilter wird die Konzentration auf ein fast nicht mehr messbares Niveau gesenkt. Stumpf et al. (1996) fanden nur in 8 von 20 untersuchten Klärwerksabflüssen natürliche Östrogene. Bei diesen entspricht die Reduktion 75 bis 91 %. Bei Johnson et al. (2000), Baronti et al. (2000) und Petrovic et al. (2002) liegen die Eliminierungsraten für E2 bei 88 %, 87 % bzw. 100 % und für E1 bei 74 %, 61 % bzw. 85 %. Tilton et al. (2002) geben Raten von 35 bis 60 % im Belüftungsbecken und 69 bis 97 % nach der kompletten Aufbereitung an. Die östrogene Aktivität, die von der Wirkung aller endokrinen Disruptoren ausgeht, wird um 70 bis 100 % gesenkt, sofern eine zweite Klärstufe vorhanden ist (Johnson et al, 2000).

Somit werden natürliche Östrogene in kommunalen Kläranlagen effektiv, aber nicht vollständig eliminiert (Stumpf et al., 1996). Der wichtigsten Klärschritt ist nach Kirk et al.

(2002) die Retentionszeit im Belebtschlammbecken. Die Retentionszeit wird von Johnson et al. (2000) mit 10 bis 14 Stunden angegeben. Für einen effektiven Abbau sind höhere Retentionszeiten erforderlich (Ternes et al., 1999 b). Belebtschlamm besteht aus einem lebenden und einem nichtlebenden Anteil. Es sind aggregierte Kolonien aerober bzw. fakultativ aerober Bakterien (z. B. verschiedene gram-negative Bakterien wie *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* u. a.), die durch eine Matrix von Schleimstoffen der äußeren Bakterienhülle zusammengehalten werden. Zur Biozönose gehört auch eine Vielzahl festsitzender oder frei beweglicher Protozoen, Pilze, Rotatorien, Nematoden und Insektenlarven. Im Inneren der Belebtschlammflocke befindet sich in der Regel ein Kern aus schwerlöslichen Kalziumphosphaten (Thomanetz, 1982; Boyle, 1993). Zunächst wird das Hormon an eine Belebtschlammflocke adsorbiert. Es folgt der erste abbauende Angriff durch Ringspaltung (Kreuzinger, 1998). Die Ringspaltung dient den Mikroorganismen als Energiequelle (Layton et al., 2000).

Die Reduktion von Östrogenen ist im Klärwerk von vielen Faktoren abhängig. Ein Klärwerk, das industrielle Abwässer aufbereitet, eliminiert Östrogene am schlechtesten (Belfroid et al., 1999; Petrovic et al., 2002). Es wird eine Reduktion von 4 % der Östrogene ermittelt (Layton et al., 2000). Vor allem die vorhandenen Klärstufen sind wichtig, da eine biologische Klärung bei gelösten Substanzen effektiver ist als eine chemische Klärung (Quéméneur und Marty, 1994). Besonders effektiv sind Sandfilter, in denen Hormone um 70 % vermindert werden können, und die Umkehrosmose, nach der sie sogar um 95 % reduziert werden können (Huang und Sedlak, 2001). Im Belebtschlammbecken ist die mikrobielle Aktivität wichtig (Kirk et al., 2002). Der Abbau ist von der Biozönose, den vorhandenen Nährstoffen und der Temperatur abhängig (Kreuzinger, 1998; Layton et al., 2000). Außerdem sind aerobe Verhältnisse im Belebtschlammbecken wichtig (Johnson et al., 2000).

Östrogene werden im Harn mit Glukuronsäure bzw. Schwefelsäure konjugiert ausgeschieden und sind damit inaktiviert und wasserlöslich. Da im Abwasser aber vor allem unkonjugierte Östrogene gefunden werden, liegt die Vermutung nahe, dass während des Klärprozesses und auch schon auf dem Weg bis zum Klärwerk eine Dekonjugation durch Enzyme von Mikroorganismen und damit eine Reaktivierung stattfindet (Belfroid et al., 1999, Larsson et al., 1999). Im Klärwerk werden 84 bis 97 % der glukoronidierten aber nur 64 % der sulfatierten Östrogene gespalten (D' Ascenzo et al. 2003). Wegener et al. (1999) konnten nachweisen, dass die Glucuronidbindung mikrobiologisch sehr schnell gespalten werden kann. *Escherichia coli* ist in der Lage, große Mengen an β -Glucuronidase zu produzieren. Da *Escherichia coli* mit dem Kot ausgeschieden wird, ist es ein typischer Vertreter des Keimspektrums im städtischen Klärwasser (Desbrow et al., 1998; Baronti et al., 2000). *Escherichia coli* produziert kaum Arylsulfatase. Somit sind andere Bakterien im Belebtschlamm an der Spaltung beteiligt (Baronti et al., 2000).

Neben dem mikrobiellen Abbau der Östrogene ist auch eine Synthese möglich. *Moraxella* und *Nocardia restrictus* sind in der Lage, Cholesterin in Östron umzuwandeln (Alfonso et al., 1966; Bhattacharyya et al., 1984). Niven et al. (2001) konnten in einem simulierten aeroben Klärprozess mit radiomarkiertem Cholesterin allerdings keine Östronmetabolite finden.

2.8.2 Biodegradation im Oberflächenwasser

Mikroorganismen in der aquatischen Umwelt sind alle mikroskopisch kleinen pflanzlichen und tierischen Lebewesen, also Bakterien, Pilze, einzellige Algen, Viren, Protozoen und die kleinsten Metazoen wie Rotatorien. Mikroorganismen bilden im Wasser eine spezielle Biozönose (Rheinheimer et al., 1992). Die Biozönose unterscheidet sich nicht nur in den verschiedenen Gewässertypen, sondern auch innerhalb eines Gewässers. Deshalb gliedert sich die Biozönose eines Gewässers in verschiedene Zonen, in denen jeweils spezifische Metabolisierungsvorgänge ablaufen (Daubner, 1972). An der Wasseroberfläche kann sich ein Mikrofilm bilden, wodurch die Bakterienzahl 10- bis 100-fach höher ist als in der darunter liegenden Wassersäule (Atlas und Bartha, 1998).

Oberflächengewässer verfügen über eine sehr gute Selbstreinigungskraft. Dabei spielen auch physikalische und chemische Prozesse wie Adsorptions- und Oxidationserscheinungen eine Rolle. Die entscheidende Bedeutung kommt aber den biologischen Vorgängen zu. Bakterien und Pilze können feste und gelöste Substanzen biodegradieren, im günstigsten Fall bis zu deren Ausgangsstoffen Kohlendioxid, Wasser und organischen Salzen (Rheinheimer, 1985). Sofern der BSB₅ unter 20 mg/l liegt, ist eine Selbstreinigung bis zur ursprünglichen Qualität möglich (Müller und Schlenker, 2004). Eine Kombination von kometabolischen Schritten bewirkt oft eine partielle Biodegradation. Wird die Substanz als Wachstumssubstrat verwendet, wird wenigstens ein Teil mineralisiert. Im Allgemeinen nutzen aerobe Mikroorganismen oxidative Reaktionswege und anaerobe Mikroorganismen reduktive Reaktionswege (Reinecke, 2001). Besonders im Sediment von Gewässern herrschen oft anaerobe Verhältnisse, so dass dort obligat anaerobe Bakterien vorkommen (Atlas und Batha, 1998). Protozoen regulieren die Bakterienpopulation und sind somit wichtig für den Selbstreinigungsprozess und den Nährstoffkreislauf der Gewässer (Pauli et al., 2001). Algen und Bakterien beeinflussen ihr Wachstum gegenseitig (Currie, 1990). Algen können organischen Verbindungen biodegradieren oder aufnehmen (Sijim et al., 1998; Lai et al., 2002)

Die Biodegradation einer Substanz ist von vielen Faktoren abhängig. So beeinflussen die Struktur und die Konzentration einer Substanz sowie die Umweltbedingungen den mikrobiellen Abbau (Alexander, 1965; Kaplan, 1979; Wang et al., 1984). Auch die Nahrungssituation, alternative oder konkurrierende organische Substrate und der pH-Wert beeinflussen die Biodegradation (Swannell et al., 1995). Ist die Substanz lipophil oder die

Konzentration zu niedrig, kann eine organische Verbindung in der Umwelt persistieren (Boethling und Alexander, 1979). *Pseudomonas fluorescens* ist ein ubiquitär vorkommender Keim (Oberflächenwasser, Grundwasser, Trinkwasser), der viele Substanzen auch in sehr niedrigen Konzentrationen abbauen kann (Kooij et al., 1982). Eine endgültige Degradation von organischen Verbindungen im Wasser kann das Resultat von komplexen Interaktionen innerhalb der Biozönose sein (Servais et al., 1987).

Die Biodegradationsgeschwindigkeit hängt besonders von der Temperatur ab (Larson et al., 1981; Bartholomew und Pfaender, 1983). Bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C steigert sich die mikrobielle Tätigkeit um den Faktor 2,5. Die Lebenstätigkeit von Wasserorganismen steigert sich bis zur Grenze von 20 bis 25 °C (Daubner, 1972).

Östrogene können durch eine Kombination aus biologischen und physikalischen Prozessen aus dem Wasser entfernt werden (Huang und Sedlak, 2001). Williams et al. (1999) verfolgten die Biodegradation von Östrogenen über 10 km lange Flussabschnitte. Es fand auf Grund der kurzen Passagezeit eine Biodegradation von maximal 8 % statt. Die Werte von 17 β -Östradiol sanken von 590 ng/kg auf 530 ng/kg und die Werte von Östron sanken von 730 ng/kg auf 640 ng/kg. Sie fanden Hinweise, dass bei einer höheren Hormonkonzentration ein größerer Prozentsatz biodegradiert wird. Die Halbwertszeit von Östrogenen wird von Williams et al. (1999) mit 2 bis 6 Tagen im Wasser und im Sediment angegeben. Der genaue Abbaumechanismus von Östrogenen ist nicht bekannt. Die Endprodukte stellen Kohlendioxid und Wasser dar (Layton et al., 2000; Petrovic et al., 2002). Allgemein sollen Östrogene gut abbaubar sein (Wegener et al., 1999).

2.9 Methoden zur Testung der biologischen Abbaubarkeit von Substanzen

Die biologische Abbaubarkeit kann in Laboratoriumsversuchen bestimmt werden. Die Versuchsergebnisse sollten aber Schlussfolgerungen hinsichtlich des Verhaltens der Testsubstanz in natürlichen Gewässern oder Kläranlagen ermöglichen. Daher sollte die Methode einige für Oberflächengewässer oder biologische Kläranlagen typische Parameter simulieren. Zudem stellen Abbautests biologische Untersuchungsverfahren dar, bei denen eine erheblich größere Schwankungsbreite der Ergebnisse vorhanden ist als bei den meisten physikalischen oder chemischen Untersuchungsmethoden (Haltrich et al., 1980).

Die „Organisation for Economic Co-operation and Development“ (OECD) ist eine europäische Organisation, die im November 1996 eine spezielle Arbeitsgruppe für endokrine Disruptoren einrichtete (Huet, 2000). Es ist zu erwarten, dass Erkenntnisse des „Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee“ (EDSTAC), einem beratenden Gremium der amerikanischen Umweltschutzbehörde, in das OECD-Programm übernommen werden (Reisner-Oberlehner, 1998). Die OECD schlägt verschiedene Tests zur Prüfung der

biologischen Abbaubarkeit vor, die auf einer Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs, der Kohlenstoffdioxid-Produktion oder des Sauerstoffverbrauchs beruhen.

Die Testsubstanz wird bei den OECD-Tests in mineralhaltiges Wasser überführt und ein Inokulum hinzugefügt. Das Inokulum kann Belebtschlamm, Wasser aus einem Kläranlagenabfluss, Oberflächenwasser, Erde oder ein Gemisch aus mehreren dieser Quellen sein. Das Inokulum soll nicht an die Testsubstanz präadaptiert sein. Bei schwach löslichen Substanzen soll außerdem eine sterile (abiotische) Kontrolle verwendet werden, um physikalische Verluste auszuschließen. Die Inkubation erfolgt aerob in Dunkelheit oder schwachem Licht und dauert bis zu 28 Tage. In dieser Zeit müssen bestimmte Werte des gelösten organischen Kohlenstoffs bzw. der Kohlenstoffdioxid-Produktion oder des Sauerstoffverbrauchs erreicht werden, sonst wird die Substanz für nicht vollständig biodegradierbar erachtet. Der ganze Versuch soll mindestens zweimal durchgeführt werden. (OECD, 1993; OECD, 2001).

Oft wird die Abbaukapazität von bestimmten Bakterien für eine bestimmte Substanz untersucht. So isolierten Ding et al. (2001) für eine Untersuchung zur Umweltverschmutzung acht effektive Mikroorganismenspezies aus Abwasser-, Schlamm- und Bodenproben. Die Identifizierung der Reinkultur kann durch fehlende Identifizierungsschemata in der aquatischen Mikrobiologie sehr schwer sein. Geeignet ist das API 20E System (API Laboratory Products, Basingstoke), mit dem z. B. *Aeromonas hydrophila*, ein gram-negatives Stäbchen, welches reichlich in natürlichem Wasser vorkommt, identifiziert werden kann (Austin, 1988). Auch *Escherichia coli* und *Pseudomonas fluorescens* sind in der Natur sehr weit verbreitet und können gut identifiziert werden (Mitscherlich und Marth, 1984). Werden Bakterien als Inokulum verwendet, sollte die Wasserprobe vor der Verwendung sterilisiert werden. Es gibt drei Methoden um Wasserproben und anderen Lösungen zu sterilisieren: Autoklavierung bei 115 °C bis 121 °C für bis zu 30 Minuten (feuchte Hitze), 160 °C oder 180 °C für zwei Stunden bzw. 30 Minuten (trockene Hitze) und Filtration mit Membranfiltern, die eine Porengröße von höchstens 0,3 µm besitzen (Schneider und Rheinheimer, 1988). Wasserproben sollten durch Hitze und nicht durch Filtration sterilisiert werden, da mehr Nährstoffe im Wasser verbleiben (Mitscherlich und Marth, 1984).

Da die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Natur verbessert wird und die komplexen Interaktionen zwischen den Mikroorganismen wiedergespiegelt werden, sind Bakteriengemeinschaften gegenüber Einzelkulturen zu bevorzugen (Boethling und Alexander, 1979; Spain und Van Veld, 1983; Cairns, 1984; Servais et al., 1987; Servais et al., 1989; Schlenker 1999 a). Mit einer Bakteriengemeinschaft kann auch Kometabolismus beobachtet werden. Kometabolismus ist die Transformation einer Substanz durch Mikroorganismen, die eine andere Verbindung als Wachstumssubstrat nutzen (Agterén et al., 1998). Es ist kaum möglich einen Mikroorganismus zu isolieren, der in Reinkultur in der Lage ist, die Substanz

abzubauen (Alexander, 1981; Wesnigk, 1991; Reinecke, 2001). In einem Versuch zur Biodegradation sollte Wasser verwendet werden, das möglichst frisch im Versuch eingesetzt wird, da Kenntnisse über Veränderungen chemisch-physikalischer und biologischer Eigenschaften während der Lagerung gering sind (Stahlschmidt-Allner und Nagel, 1993). Es sollten geeignete Parameter gefunden werden, um die Wasserprobe zu charakterisieren und um Veränderungen während der Tests zu erkennen (Kalsch et al., 1997). Die Zählung der Bakterienkolonien aus natürlichen Wasserproben ist sehr unsicher, da viele Bakterienarten nicht kultivierbar sind (Atlas und Bartha, 1998). Weiter spielt der Ort und die Methode der Probenentnahme sowie die Jahreszeit eine Rolle, da sich die Biozönose jeweils unterscheidet (Austin, 1988; Bartholomew und Pfaender, 1983). Viele Forscher filtern die natürlichen Wasserproben, bevor sie im Versuch eingesetzt werden. Dabei muss bedacht werden, dass an den herausgefilterten Partikeln Mikroorganismen haften und organisches Material entfernt wird (Howard, 1985). Die abbauenden Bakterien können durch Protozoen oder Nahrungsmangel sterben (Wiggins et al., 1987; Huang et al. 1981; Ramadan et al., 1990). Erfolgt die Inkubation bei einer anderen Temperatur als die Entnahme, wird die Biodegradationsgeschwindigkeit nicht derjenigen in der Natur entsprechen (Howard, 1985). Eine Verlangsamung des Wachstums der Bakterien und damit eine längere Akklimatisationsperiode vor dem Abbau durch fehlende anorganische Nährstoffe ist denkbar, vor allem wenn Bakterien um die begrenzt zur Verfügung stehenden Nährsalze konkurrieren (Jones und Alexander, 1988; Ramadan et al., 1990). Werden die Proben im Dunkeln gelagert, erfolgt kein Algenwachstum und eine Photooxidation kann vermieden werden (Rheinheimer et al., 1992). Bei den Biodegradationsversuchen von Mann und Boddy (2000) wurde die Biodegradation durch Belichtung verlangsamt.

In Bezug auf die Testsubstanz ist vor allem deren Konzentration ein wichtiger Einflussfaktor auf die Biodegradation. Ist die Konzentration der Testsubstanz im Versuch zu hoch, kann die Biodegradation nicht auf die Natur übertragen werden, da eventuell bei niedriger Konzentration keine oder schlechtere Biodegradation erfolgt bzw. die Substanz nur adsorbiert wird (Boethling und Alexander, 1979; Zaidi et al., 1989). Andererseits kann der Abbau bei hohen Konzentrationen durch toxische Wirkungen gehemmt werden (Römbke et al., 1996). Wird die Testsubstanz gefiltert, ist eine Adsorption an den Filter möglich (OECD, 2001).

Sind Daten über den Abbau gewonnen, kann der Verlauf des Abbaus mit mathematischen Funktionen (Modellen) abgeschätzt werden (Howard, 1984; Lewis et al., 1984; Simkins und Alexander, 1984; Schmidt et al., 1985; Cowan et al., 1995; Mackay et al. 1996). Sehr häufig wird versucht, den zeitlichen Verlauf des Abbaus mit einer Kinetik erster Ordnung zu beschreiben. Der Abbau verläuft hierbei exponentiell, die Abbaugeschwindigkeit ist proportional zur Substratkonzentration. Der Vorteil ist, dass für verschiedene Stoffe Halb-

wertszeiten des Abbaus oder Zeiten, zu denen ein bestimmter Anteil abgebaut ist, angegeben werden können, die untereinander vergleichbar sind (Kalsch et al. 1997). Auch sigmoide Kurven werden beschrieben (Hoover et al., 1986).

2.10 Methoden zur Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit von Östrogenen

Der mikrobielle Abbau von radiomarkiertem 17β -Östradiol (58 $\mu\text{g/l}$) wurde von Layton et al. (2000) im Abwasser untersucht. Im Labor werden 55 % innerhalb einer Stunde abgebaut und ca. 75 % innerhalb von zwei bis drei Stunden, wobei die Adaptation der Mikroorganismen entscheidend ist. Werden die Mikroorganismen abgetötet, bleibt die östrogene Aktivität erhalten.

In den Untersuchungen von Wegener et al. (1999) stammte das Wasser aus dem Ablauf einer Kläranlage, enthielt eine typische Bakteriengemeinschaft und wurde mit 17β -Östradiol versetzt. Das Testmedium wurde während des Versuchs weder gerührt noch belüftet. Die Abbauprobe fanden im Dunkeln bei einer Temperatur von 20 °C und unter mikroaeroben Bedingungen statt. Die Untersuchung des mikrobiologischen Abbaus und der biologischen Wirksamkeit erfolgte mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie und Hefezell-Assay. 17β -Östradiol erwies sich bei einer Anfangskonzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ innerhalb weniger Tage (7 bis 8 Tage) als vollständig abbaubar. Als Zwischenprodukt wird dabei Östron gebildet, welches durch Oxidation der Hydroxyfunktion in 17-Stellung entsteht. Die östrogene Aktivität im Hefezell-Assay nahm während des gesamten Versuchs ab. Der Abbau von 17β -Östradiol verhielt sich bei einer niedrigeren Anfangskonzentration von 100 ng/l in gleicher Weise wie bei 10 $\mu\text{g/l}$.

Ternes et al. (1999 b) untersuchten den Einfluss von Belebtschlamm auf die Konzentration von Östrogenen. Belebtschlamm wurde mit Trinkwasser verdünnt und Östron bzw. 17β -Östradiol hinzugefügt (1 $\mu\text{g/ml}$). Die Ansätze wurden über den Untersuchungszeitraum von 72 h horizontal geschüttelt, um eine homogene Suspension und aerobe Verhältnisse zu gewährleisten. Es wurden in sehr kurzen Zeitabständen Proben entnommen und die Östrogenkonzentration bestimmt. Während der ersten 1 bis 3 h wurden über 95 % des 17β -Östradiols abgebaut, wobei die Konzentration von Östron in entsprechendem Ausmaß anstieg, da 17β -Östradiol zu Östron oxidiert wird. Nach 5 h wurden weder 17β -Östradiol noch Östron oberhalb des Detektionslimits gefunden. Wurde Östron der Belebtschlammverdünnung zugefügt, fiel die Östronkonzentration nach 24 h auf ca. 50 % ab. Es wurden keine weiteren Metabolite gefunden.

Fujii et al. (2002) isolierten aus Belebtschlamm von einem Klärwerk in Tokio eine Bakterienart, die Östron, 17β -Östradiol und Östriol biodegradieren kann. Es handelt sich vermutlich um eine neue *Novosphingobium*-Art. Die Hormone stellten die einzige Kohlenstoffquelle

dar. Es konnten keine weiteren toxischen oder akkumulativen Metabolite während der Biodegradation von 17 β -Östradiol nachgewiesen werden. Aus Wasser- und Bodenproben, die aus der Umwelt entnommen wurden, sowie aus Abwasserproben konnten keine Mikroorganismen isoliert werden, die Östrogene in Reinkultur biodegradieren können. Yoshimoto et al. (2004) konnten ebenfalls aus Belebtschlamm Bakterienarten isolieren, die Östrogene in Reinkulturen biodegradieren können. Sie wurden als *Rhodococcus equi* und *Rhodococcus zopfii* identifiziert.

Jürgens et al. (2002) entnahmen von verschiedenen Flüssen Wasserproben aus einer Tiefe von bis zu 0,5 m im Frühling, Sommer und Winter, um die Biodegradation von 17 β -Östradiol zu untersuchen. Es wurden verschiedene Konzentrationen (20 ng/l bis 500 μ g/l) von 17 β -Östradiol verwendet und bei 10 °C bzw. 20 °C in Dunkelheit gelagert. Regelmäßig wurden daraus Proben entnommen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit sterilisiertem Wasser. Die Mikroorganismen aus dem Flusswasser waren in der Lage 17 β -Östradiol in Östron mit einer Halbwertszeit von 0,2 bis 9 Tagen bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C umzuwandeln. Östron wurde mit einer ähnlichen Geschwindigkeit weiter abgebaut. Mit einem Hefezell-Assay wurden keine weiteren östrogen wirksamen Metabolite identifiziert. Lag die Lagerungstemperatur bei 10 °C, dauerte die Biodegradation ungefähr doppelt so lange wie bei 20 °C. Die Biodegradation verlief bei unterschiedlichen 17 β -Östradiolkonzentrationen ähnlich, wobei sich andeutete, dass eine niedrige Östrogenkonzentration etwas schneller biodegradiert wird. In den autoklavierten Wasserproben fand keine Veränderung der Östronkonzentration statt.

Um die Frage zu beantworten, ob die Moleküle vollständig mineralisiert wurden oder ob persistente Nebenprodukte entstehen, wurde radiomarkiertes Kohlenstoffdioxid an die Position 4 des A-Ringes von 17 β -Östradiol eingefügt. Durch die Beobachtung der Freisetzung des radiomarkierten Kohlenstoffdioxids konnte gezeigt werden, dass Bakteriengemeinschaften aus Flusswasser (Jürgens et al., 2002), sowie aus Abwasser (Layton et al., 2000) in der Lage sind, den A-Ring zu spalten und damit die Molekülstruktur zu zerstören.

Schlenker et al. (1999 a) testeten den Einfluss von *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* auf Östron durch in-vitro-Versuche. Eine Nährbouillon wurde mit *Escherichia coli* bzw. *Clostridium perfringens* beimpft, anschließend Östron zugefügt (80 pg/10 μ l) und über 48 h bei 37 °C aerob bzw. 42 °C anaerob inkubiert. Die Ausgangs- und Endkonzentration von Östron wurde mit einem Enzymimmunoassay bestimmt. Bei *Clostridium perfringens* deutete sich eine mikrobiell-enzymatische Metabolisierung des Östrons an, bei den Ansätzen mit *Escherichia coli* nicht. In derartigen Versuchen kann die Betrachtung des Einflusses von einzelnen Spezies zwar Hinweise über deren Aktivität liefern, aber die Komplexität der mikrobiellen Vorgänge in einer Biozönose bleiben unbeachtet.

Von Colucci und Topp (2001) und Colucci et al. (2001) wurde das Verbleiben von 17β -Östradiol, Östron und 17α -Ethinylöstradiol in landwirtschaftlichen Bodenproben untersucht. Die genannten Substanzen wurden in nicht sterilen Bodenproben schnell vermindert. Die östrogene Aktivität, gemessen mit einem Hefezell-Assay, nahm ebenfalls schnell ab. Es wird ein mikrobieller Abbau vermutet. Die Umwandlung von 17β -Östradiol zu Östron erfolgte aber auch in sterilen Bodenproben, so dass bei diesem Prozess von einer abiotischen Transformation ausgegangen wird.