

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodische Vorbereitungen

In den Vorversuchen wurde überprüft, ob das Versuchsmodell und die Bestimmungsmethode geeignet sind, den Verlauf der Östronkonzentration über einen längeren Zeitraum im Flusswasser zu verfolgen. Bei allen Ansätzen ist eine Abnahme der Östronkonzentration zu verzeichnen, die von der Temperatur während der Probenlagerung abhängig war.

Die Stabilität von Östron wurde zusätzlich im destillierten Wasser untersucht. Über 56 Tage konnte keine wesentliche Abnahme der Östronkonzentration festgestellt werden. Demnach kann ein abiotischer Zerfall oder eine Adsorption an die Gefäßwand ausgeschlossen werden, obwohl auf Grund des hohen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von Östrogenen eine Tendenz zur Adsorption besteht (Huang und Sedlak, 2001).

In den Untersuchungen wurde eine Östron-Ausgangskonzentration von 150 pg/10 µl Wasser (15 µg/l) angestrebt. Ähnliche Östron- bzw. 17β-Östradiolkonzentrationen wurden auch von anderen Autoren verwendet. Wegener et al. (1999) setzten 100 ng/l und 10 µg/l ein, Schlenker et al. (1999 a) 8 µg/l, Ternes et al. (1999 b) 1 µg/l und Layton et al. (2000) 58 µg/l. Jürgens et al. (2002) untersuchten unterschiedliche Konzentrationen zwischen 20 ng/l und 500 µg/l. Im Flusswasser wurden Östron- und 17β-Östradiolkonzentrationen im ng-Bereich gemessen (Belfroid et al., 1999; Wegener et al., 1999; Huang und Sedlak, 2001). Die niedrigen Konzentrationen bei den Untersuchungen von Wegener et al. (1999) und Jürgens et al. (2002) entsprechen am ehesten den in Flüssen vorkommenden Konzentrationen. Die verschiedenen Konzentrationen werden alle mit ähnlichen Geschwindigkeiten abgebaut. Die gewählte Konzentration von 15 µg/l ist also geeignet, um den Abbau von Östron bzw. 17β-Östradiol im Wasser als Laborexperiment zu untersuchen. Eine Übertragung auf natürliche Bedingungen ist aber nicht uneingeschränkt möglich, da das Wasser in einem abgeschlossenen System gelagert wird. Die chemisch-physikalischen und die biologischen Eigenschaften des Wassers verändern sich während der Lagerung und damit ändern sich die Lebensbedingungen für die Mikroorganismen (Currie, 1990; Stahlschmidt-Allner und Nagel, 1993; Pauli et al., 2001). Die Biozönose entspricht nach einer Lagerung nicht mehr derjenigen am Entnahmeort.

Die rechnerisch eingesetzte Anfangskonzentration von 150 pg/10 µl Wasser wurde nicht bei allen Ansätzen tatsächlich gemessen. Zu niedrige Ausgangswerte könnten durch die Filtration der Lösung verursacht werden. Da Östrogene lipophil sind (Ying et al., 2002), können sie an der beschichteten Filtermembran adsorbiert werden (OECD, 1993).

Andererseits könnten die Östrogene in der Stammlösung inhomogen verteilt sein, was zu niedrigen aber auch zu hohen Ausgangswerten führen kann.

Durch die Vorversuche konnte die Praktikabilität der Versuchseinstellung bestätigt werden.

## 5.2 Östrogenabbau im Flusswasser

Es wurde angenommen, dass Östron und 17 $\beta$ -Östradiol von Mikroorganismen im Flusswasser abgebaut werden können und dass die Temperatur diesen Prozess beeinflusst. Um auszuschließen, dass das Flusswasser abiotische Faktoren enthält, die für eine Reduzierung der Konzentration im Wasser verantwortlich sind, wurden parallel Varianten mit sterilisiertem Flusswasser aus jeweils der gleichen Charge Flusswasser untersucht. Die Varianten wurden dreifach angesetzt, da nach den OECD-Richtlinien (1993) Biodegradationsversuche mindestens zweimal durchgeführt werden sollen.

In allen Ansätzen mit Flusswasser ist eine Abnahme der Östronkonzentration zu beobachten, die als mikrobiell-enzymatischer Abbau bzw. Biodegradation interpretiert wird. Bakterien können Substanzen im günstigsten Fall bis zu deren Ausgangsstoffen (Kohlendioxid, Wasser, organische Salze) biodegradieren (Rheinheimer, 1985). Die Temperatur beeinflusst die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme, da sich die mikrobielle Tätigkeit bei einer Temperaturerhöhung steigert (Daubner, 1972). Während bei einer niedrigen Temperatur (5 °C) die Östronkonzentration erst nach 21 bis 42 Tagen um über 90 % reduziert wurde, ist dies bei höheren Temperaturen schneller der Fall. Bei 20 °C und 30 °C wurde die Östronkonzentration nach 2 bis 14 Tagen um über 90 % reduziert. Die untere Nachweisgrenze wurde bei 30 °C am schnellsten erreicht (2 bis 14 Tage bei 30 °C, 6 bis 14 Tage bei 20 °C und 21 bis 56 Tage bei 5 °C).

Der Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol, der Vorstufe von Östron, wurde bei 20 °C untersucht. Es wurde erwartet, dass 17 $\beta$ -Östradiol im Flusswasser langsamer als Östron mikrobiell-enzymatisch abgebaut wird, da während des Abbaus von 17 $\beta$ -Östradiol zunächst Östron als erste Abbaustufe entsteht (Ternes et al., 1999 b). Der Enzymimmunoassay erfasst sowohl 17 $\beta$ -Östradiol als auch Östron, so dass nicht unterschieden werden kann, ob 17 $\beta$ -Östradiol oder Östron gemessen wird. Nach 4 bis 12 Tagen wurde die 17 $\beta$ -Östradiolkonzentration um über 90 % reduziert. Somit erfolgte der Abbau von 17 $\beta$ -Östradiol nicht langsamer als von Östron. Es wird geschlussfolgert, dass die Umwandlung von 17 $\beta$ -Östradiol zu Östron keine Verzögerung bei der Biodegradation von Östrogenen darstellt. Nach Colucci et al. (2001) handelt es sich bei dieser Umwandlung um einen abiotischen Prozess.

Jürgens et al. (2002) und Wegener et al. (1999) untersuchten den Abbau von Östrogenen unter ähnlichen Lagerungsbedingungen und sind zu entsprechenden Ergebnissen gekommen. Jürgens et al. (2002) entnahmen Flusswasser aus einer ähnlichen Tiefe (ca. 0,5 m) und lagerten die Ansätze mit 17 $\beta$ -Östradiol. Aus den Abklingkurven wurden die Halbwertszeiten berechnet, da von einer einfach exponentiellen Anpassung ausgegangen wurde. 17 $\beta$ -Östradiol wurde mit einer Halbwertszeit von 0,2 bis 9 Tagen bei 20 °C abgebaut. Östron wurde in ähnlicher Zeit weiter abgebaut. Betrug die Lagerungstemperatur nur 10 °C,

dauerte der Abbau ungefähr doppelt so lange. Bei den Untersuchungen von Wegener et al. (1999) stammte das Wasser aus dem Ablauf einer Kläranlage und das zugefügte 17 $\beta$ -Östradiol wurde bei 20 °C innerhalb von 7 bis 8 Tagen vollständig abgebaut. Williams et al. (1999) ermittelten für Östrogene eine Halbwertszeit von 2 bis 6 Tagen in einem Fluss. Layton et al. (2000) und Jürgens et al. (2002) konnten zeigen, dass Bakteriengemeinschaften aus Flusswasser und aus Abwasser die Molekülstruktur von 17 $\beta$ -Östradiol vollständig zerstören können. Dies wurde parallel im Bioassay nachgewiesen. Auch in landwirtschaftlichen Böden sind Bakteriengemeinschaften vorhanden, die Östrogene mit einer Halbwertszeit von weniger als einem halben Tag biodegradieren können. Da keine Lag-Phase vorhanden ist, scheinen die Mikroorganismen an die Verwertung von Östrogenen adaptiert zu sein (Colucci et al., 2001).

In den Ansätzen mit sterilisiertem Flusswasser erfolgte während der Versuchsdauer keine Konzentrationsabnahme von Östron bzw. 17 $\beta$ -Östradiol. Wie im Aqua bidest. sind auch im sterilisierten Flusswasser keine abiotischen Faktoren vorhanden, die einen Abbau verursachen können. Eine Photodegradation oder Verdunstung von Östrogenen, die nach Schweinfurth et al. (1996) und Liu und Liu (2004) auftreten können, wurden durch eine Lagerung bei Dunkelheit und unter Verschluss nahezu ausgeschlossen.

Auch bei den Untersuchungen von Schlenker et al. (1999 a), Layton et al. (2000), Colucci et al. (2001) und Jürgens et al. (2002) änderte sich die Hormonkonzentration im sterilen Milieu nicht signifikant und die östrogene Aktivität blieb erhalten.

Untersuchungen zur Östronkonzentration erfolgten außerdem mit einem Zusatz von Belebtschlamm. Es wurde von der Hypothese ausgegangen, dass der Abbau von Östron durch Belebtschlamm beschleunigt wird. Im Aqua bidest. mit einem Belebtschlamminokulum sank die Östronkonzentration innerhalb von 4 bis 8 Tagen um über 90 %. Im Flusswasser mit einem Belebtschlamminokulum sank die Östronkonzentration sogar etwas schneller. Über 90 % des Östrons war schon nach 4 Tagen abgebaut. Der schnellere Abbau könnte durch den Keimgehalt im Flusswasser (im Gegensatz zu Aqua bidest.) hervorgerufen worden sein. Im Flusswasser aus der gleichen Charge ohne ein Belebtschlamminokulum findet in den ersten vier Tagen kaum eine Verminderung der Östronkonzentration statt. Das könnte auf eine bessere Adaptation der Bakterien im Belebtschlamm an die Verwertung von Östron hinweisen (Layton et al., 2000). In den Untersuchungen von Ternes et al. (1999 b) wurde 17 $\beta$ -Östradiol im Belebtschlamm zu 95 % innerhalb von 1 bis 3 Stunden abgebaut und Östron zu 50 % in 24 Stunden. Layton et al. (2000) ermittelten für 17 $\beta$ -Östradiol Abbauraten von 75 % innerhalb von 2 bis 3 Stunden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde erst nach 48 Stunden zum ersten Mal gemessen und in dieser Zeit war bis zu 90 % der Östronkonzentration abgebaut.

Wurde der Belebtschlamm vor der Verwendung im Versuch autoklaviert, blieb die Östronkonzentration vom Beginn bis zum Ende der Lagerung auf einem ähnlichen Niveau. Die Verluste von Östron durch Adsorption an Belebtschlammflocken können also vernachlässigt werden. Auch bei den Untersuchungen von Fürhacker et al. (1999) blieb der allergrößte Teil des Hormons in der wässrigen Phase.

Während der Lagerung der Proben wurde von allen Varianten regelmäßig eine Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) vorgenommen bzw. die Sterilität überprüft. Im Flusswasser wurden zu Beginn der Lagerung zwischen  $10^3$  und  $10^5$  KbE/ml gezählt. Der Belebtschlamm wurde verdünnt, bis sich eine Anzahl von  $10^4$  bis  $10^5$  KbE/ml einstellte. Die Anzahl der KbE sank während der Lagerung überwiegend um ein bis drei Zehnerpotenzen, so dass am Ende der Untersuchung  $10^1$  bis  $10^4$  KbE/ml vorhanden waren, wodurch ein mikrobiell-enzymatischer Abbau bis zum Ende der Untersuchungszeit theoretisch möglich war. Das Überleben der Bakterien hätte durch einen Zusatz von anorganischen Nährstoffen eventuell verbessert werden können (Jones und Alexander, 1988; Ramadan et al., 1990), aber dadurch hätten sich die Eigenschaften des Wassers im Versuch gegenüber dem Wasser vom Entnahmeort verändert. Die Anzahl der KbE kann nicht den realistischen Bakteriengehalt widerspiegeln, da mit Agarplatten nur wenige Prozent aller Bakterien aus Flusswasser oder Belebtschlamm kultiviert werden können (Thomanetz, 1982; Atlas und Bartha, 1998). Die steril angesetzten Varianten blieben bis zum Ende der Untersuchung steril.

Eine weitere Fragestellung war, ob im Flusswasser vorhandene Bakterienspezies in Reinkultur in der Lage sind, Östron abzubauen. *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aeromonas hydrophila* konnten aus dem Flusswasser isoliert werden und wurden jeweils mit  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml eingesetzt. Sie wurden als typische Vertreter der Flusswasserflora ausgewählt, da sie vergleichsweise leicht isolierbar und kultivierbar sind (Mitscherlich und Marth, 1984; Austin, 1988). Das Flusswasser wurde vor der Verwendung autoklaviert und Östron als Zusatz zu den im sterilisierten Flusswasser vorhandenen Nährstoffen angeboten. Eine Sterilisierung durch Filtration hätte viele Nährstoffe aus dem Wasser entfernt (Mitscherlich und Marth, 1984). Zusätzlich wurde anstelle von Flusswasser Natriumchlorid-Lösung verwendet.

Während der 56-tägigen Lagerung bei 20 °C traten zum Teil erhebliche Schwankungen der Östronkonzentration auf. Aber eine Tendenz zur Konzentrationsabnahme konnte nicht festgestellt werden. Die Hypothese, dass keiner der isolierten Keime solitär in der Lage ist, Östron abzubauen, wurde unter den gegebenen Bedingungen bestätigt. Die Anzahl der Kolonien von *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aeromonas hydrophila* veränderte sich während der Lagerung nur wenig. Sie vermehrten bzw. verminderten sich um maximal eine Zehnerpotenz.

In den Versuchsansätzen von Schlenker et al. (1999 a) wurde bei einem Ansatz mit inokulierten *Escherichia coli* innerhalb von 48 Stunden ebenfalls keine Verminderung der Östronkonzentration festgestellt. Dagegen schien sich eine mikrobiell-enzymatische Metabolisierung von Östron im anaeroben Ansatz mit inokulierten *Clostridium perfringens* nach einer 48-stündigen Inkubation bei 42 °C anzudeuten. Auch Fujii et al. (2002) konnten aus Wasser- und Bodenproben kein Bakterium isolieren, welches in Reinkultur Östrogene abbaut. Nur aus Belebtschlamm konnten zwei Bakterienarten isoliert werden, die dazu befähigt waren (Fujii et al., 2002; Yoshimoto et al., 2004). Eine Erklärung für die Schwierigkeiten bei der Isolierung von Bakterien, die Östrogene in Reinkultur abbauen können, könnte eine kometabolische Verwertung von Östrogenen durch Bakteriengemeinschaften sein (Alexander, 1981; Wesnigk, 1991; Agterén et al., 1998; Reinecke, 2001).

Da nach Kalsch et al. (1997) geeignete Wasserparameter gefunden werden sollen, um eine Wasserprobe zu charakterisieren, wurden mindestens einmal pro Monat folgende Eigenschaften des Flusswassers untersucht: Temperatur, pH-Wert, PO<sub>4</sub>-P, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, CSB und BSB<sub>5</sub>. Für Organismen, die im Wasser leben, ist ein pH-Wert von 7,0 bis 7,4 optimal. Der gemessene pH-Wert (7,9 bis 8,09) liegt leicht darüber (Daubner, 1972). Die Wasserproben können in die Güteklasse II eingestuft werden, da der BSB<sub>5</sub> zwischen 2 und 6 mg/l (Müller und Schlenker, 2004) und der Nitritgehalt zwischen 0,018 und 0,055 mg/l liegt. Der Nitratgehalt entspricht sogar einer höheren Güteklasse. Der Phosphatgehalt liegt zwischen 0,34 mg/l und 1,29 mg/l. Werte über 0,3 mg/l weisen auf eine fäkale Verunreinigung des Wassers hin (Klee, 1990).

### 5.3 Optimierung der Mess- und Auswertmethode

Der Enzymimmunoassay ist geeignet, um den Verlauf der Östron- bzw. 17β-Östradiolkonzentration im Wasser zu verfolgen. Da es sich bei Abbautests um biologische Untersuchungsverfahren handelt, ist eine gewisse Schwankungsbreite der Ergebnisse nicht zu vermeiden (Haltrich et al., 1980). 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 manuell oder automatisch untersucht werden. Allerdings dürfen die Proben nicht verschmutzt sein, da sonst die Wiederfindungsrate sehr schlecht ist (Ghonheim, 1989; Knopp et al., 1999; Huang und Sedlak, 2001). Weitere Metabolite müssen nicht bestimmt werden, da von einigen Autoren mit in-vitro-Tests gezeigt werden konnte, dass die östrogene Aktivität verloren geht, sobald Östron nicht mehr nachweisbar ist (Wegener et al., 1999; Colucci et al., 2001). Chromatographische Verfahren zur Bestimmung der Östrogenkonzentration werden zwar oft verwendet, diese sind aber im Vergleich zum Enzymimmunoassay wesentlich aufwendiger und teurer (Sedlak et al., 2000).

Bei der Verwendung des Enzymimmunoassays gibt es aber auch verschiedene Schwachpunkte. Die Standardkurven wurden in den Hauptversuchen mit dem Auswertprogramm EIA-Star berechnet. Das Auswertprogramm EIA-Star, das die OD-Werte normiert und auf prozentualen Bindungen basiert, ist für Messungen im mittleren Bereich der Standardkurve konzipiert. Bei Verlaufsuntersuchungen zum Hormonabbau kann aber die Konzentration des Hormons zunächst relativ hoch sein und dann bis zur Nachweisgrenze absinken. Somit werden auch die äußeren Bereiche der Standardkurve zur Berechnung der Konzentration aus der optischen Dichte verwendet. In den äußeren Bereichen führt aber eine kleine Änderung der optischen Dichte zu einer sehr stark veränderten Konzentrationsangabe. Die sehr hohen und niedrigen Konzentrationen weisen daher eine sehr hohe Varianz auf. Es gibt weitere Fehlerquellen, die sich auf den Verlauf der Konzentration auswirken können. Die Mikrotiterplatten wurden manuell bestückt, so dass subjektive Fehler die Ergebnisse beeinflussen können. Für eine Verlaufsuntersuchung dienten mehrere Mikrotiterplatten, die jeweils neu kalibriert werden mussten. Hohe Variationskoeffizienten können durch eine Störung des Enzymimmunoassays durch biologisches Material hervorgerufen werden. So gelangt mit dem Belebtschlamm sehr viel biologisches Material in die Lösung. Durch Filtration könnte das biologische Material zwar entfernt werden, es würden aber viele Mikroorganismen verloren gehen. Damit wären die Biodegradationsbedingungen im Vergleich zum Entnahmeort stark verändert (Howard, 1985).

In einem Ergänzungsversuch wurde versucht, die Varianzen der Östrogenkonzentration, die im Vor- und Hauptversuch während des Verlaufs auftraten, zu vermindern (Giese et al., 2003). Für eine Verlaufsuntersuchung wurde nur eine Mikrotiterplatte verwendet. So entfällt der Einfluss von den Fehlern, die sich insbesondere im Interassay widerspiegeln.

Aus der Dreifachbestimmung wurde der Medianwert für die weiteren Berechnungen verwendet, so dass der Einfluss extremer Messfehler gedämpft wurde. Die Kalibration des Zusammenhangs zwischen OD-Werten und Konzentrationswerten wurde abweichend vom Auswertprogramm EIA-Star (Cayman, 2000) direkt zwischen den Medianen der OD-Werte und den Konzentrationsstufen vorgenommen. Die Standardkurve wurde mit einer logistischen Funktion beschrieben. Diese Kalibration führte zu niedrigeren Konzentrationswerten, die den eingesetzten Konzentrationen besser entsprachen. Die Varianzen der Östrogenkonzentrationen konnten während des Verlaufs vermindert werden.

Verschiedene nichtlineare Kurvenverläufe sollten an die im Ergänzungsversuch gewonnenen Daten angepasst werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine exponentielle Funktion und eine doppelt exponentielle Funktion unzureichend geeignet sind, die Daten darzustellen, da die Summe der quadratischen Abweichungen deutlich höher ist als bei einer logistischen Funktion. Die sigmoide Kurve nach einer logistischen Funktion passt sich gut den Messwerten an.

Jürgens et al. (2002) passten die Verlaufskurven der Hormonkonzentration mit einem Model Manager Programm an und verwenden dafür eine exponentielle Funktion (Kinetik erster Ordnung). Apoteker und Thévenot (1983) weisen aber auf die Grenzen der Kinetik erster Ordnung für die Abschätzung des Verhaltens in Fließgewässern hin. Gerade wenn eine Substanz sehr niedrig konzentriert vorliegt, hängt die Abbaukinetik oft in kaum vorher-sagbarer Weise von der Existenz von Kosubstraten ab (Subba-Rao et al., 1982). Die Abbaurrate kann also von der Konzentration der Substanz und den Umgebungsbedingungen abhängen. Eine Übertragung von Modellanpassungen auf die Umwelt ist sehr kompliziert. Es kann an jedem Standort ein anderes Muster der Konzentrationsabhängigkeit erwartet werden, unter anderem abhängig von der dortigen Biozönose (Kalsch et al., 1997).

#### **5.4 Bedeutung der Östrogene für die Umwelt**

Xenoöstrogene, Phytoöstrogene, synthetische Östrogene sowie natürliche Östrogene, die in die Umwelt gelangen, können auf Tiere und Menschen einwirken (Shape und Skakkebaek, 1993; Colborn, 1996). Sofern es um die Beurteilung der Störungen geht, ist es sinnvoll, die endokrinen Disruptoren in ihrer Gesamtheit zu betrachten, da sich die Wirkungen der einzelnen Substanzen gegenseitig beeinflussen und addieren. Soll aber die Gefährdung beurteilt werden, die von einer bestimmten Substanz ausgeht, sind Untersuchungen über die Menge, die in die Umwelt gelangt, die Eintragspfade, den Verbleib und die biologische Wirksamkeit wichtige Faktoren. Bisher standen Xenoöstrogene im Vordergrund, obwohl natürliche und synthetische Östrogene wesentlich stärker wirksam sind. Eine negative Beeinflussung besonders von wildlebenden Tieren ist denkbar, zumal Östrogene wahrscheinlich bei alle Tierarten Wirkungen hervorrufen können, besonders in frühen Entwicklungsstadien (Gimeno et al., 1996). Darüber hinaus haben Östrogene eine Tendenz zur Bioakkumulation (Larsson et al., 1999; Matthiessen, 2001; Tilton et al., 2002).

Durch die Untersuchungen wird deutlich, dass Östrogene zwar von Bakteriengemeinschaften in Flusswasser biodegradiert werden können, die Zeit bis zum völligen Abbau aber unterschiedlich lang ist. Vor allem die Temperatur beeinflusst die Abbaukinetik. Im Sommer müsste der Abbau deutlich schneller als im Winter erfolgen. Im Winter kann der langsamere Abbau zu einer sehr weiten Verbreitung der Östrogene im Fluss führen.

Parallel zu jeder Versuchsserie wurden Kontrollansätze hergestellt, denen keine Östrogenlösung zugefügt wurde. Im Flusswasser und im Belebtschlamm wurde eine geringe Östrogenkonzentration gemessen. Da nicht weiter spezifiziert werden kann, um welche Östrogene es sich handelt, werden sie als Östronäquivalente bezeichnet, da Östron als Standard verwendet wurde. Es ist anzunehmen, dass in den Flusswasserproben und in den Belebtschlammproben Östrogene vorhanden sind. Nach einer Lagerung der Kontrollansätze konnten die Östronäquivalente nicht mehr nachgewiesen werden, woraus geschlossen wird,

dass ein Abbau erfolgte. Da die gemessenen Konzentrationen auf prozentualen Bindungen beruhen, die in den Kontrollansätzen nahe der Nachweisgrenze liegen und die Standardkurve in diesem Bereich nicht optimal für die Konzentrationsberechnung geeignet ist, können diese Ergebnisse nur unter diesem Vorbehalt betrachtet werden.

Der Östrogeneintrag durch Klärwerksabflüsse in das Oberflächenwasser könnte verringert werden, indem das Klärwasser länger im Belebungsbecken verbleibt oder spezielle Verfahren wie Ozonung, Filtration oder Umkehrosmose angewendet werden. So könnten die Östrogene effektiver entfernt werden (Ternes et al., 1999 b; Schäfer et al., 2003). Außerdem kann durch adaptierte Biozönosen, eine ausreichende Temperatur und aerobe Verhältnisse im Belebtschlammbecken die Biodegradationsgeschwindigkeit von Östrogenen positiv beeinflusst werden (Quéméneur und Marty, 1994; Kreuzinger, 1998; Johnson et al., 2000; Layton et al., 2000; Huang und Sedlak, 2001).

Die Stabilität von Östrogenen im Dung und in der Gülle kann durch die Lagerungsverhältnisse beeinflusst werden. Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der Lagerungsdauer sowie –bedingungen auf den Abbau von Östrogenen liegen kaum vor. In den Untersuchungen von Schlenker et al. (1999 b) fiel die Östrogenkonzentration in Kotproben bei einer Lagerungstemperatur von 5 °C in der 12. Woche und bei 30 °C in der 3. Woche unter den Ausgangswert. Dobretsberger (1996) und Möstl et al. (1997) fanden nach einem halben Jahr im Inneren eines Dunghaufens aus einem Abkalbestall weitaus geringere Östrogenkonzentrationen als an der Oberfläche. Dieser Unterschied wurde von den Autoren als Abbau durch anaerobe Mikroorganismen interpretiert. Die Stabilität von Östrogenen im Dung ist unter anderem von der Temperatur, den Lichtverhältnissen und der Sauerstoffversorgung abhängig (Schlenker et al., 1999 b; Lange et al., 2002). Auch in landwirtschaftlichen Böden findet ein Abbau von Östrogenen statt (Colucci et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Umweltgefährdung durch natürliche Östrogene vor allem für die Organismen besteht, die mit diesen in unmittelbarem Kontakt kommen können. Dies sind z. B. Fische, die in der Nähe von Klärwerksabflüssen leben. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist anzunehmen, dass Östrogene vollständig abbaubar sind und es somit nicht zu einer Akkumulation im Wasser kommt. Die Zeitspanne für den vollständigen Abbau im Wasser schwankt nach den eigenen Untersuchungen und nach Literaturangaben zwischen ca. 2 und 42 Tagen (vor allem abhängig von der Temperatur). Organismen sind in dieser Zeit gefährdet, bzw. fortwährend bei ständigem Eintrag von Östrogenen. Dabei sind kumulative Effekte mit anderen östrogen wirksamen Substanzen anzunehmen. Durch spezielle Verfahren in Kläranlagen und angepassten Lagerungsbedingungen von Dung und Gülle könnte der Eintrag von Östrogenen vermindert werden.

## 5.5 Schlussfolgerungen

1. Im Flusswasser findet ein Abbau von Östrogenen statt. Das wird als Biodegradation interpretiert, da im sterilisierten Wasser kein Abbau festgestellt wurde. Im Vergleich zur Temperatur von 5 °C ist die Biodegradation bei 20 °C und 30 °C beschleunigt.
2. Die aus dem Flusswasser isolierten Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aeromonas hydrophila*) sind solitär nicht in der Lage, Östron zu metabolisieren. Offensichtlich sind nur adaptierte Mikroökosysteme effektiv.
3. Obwohl Östron die erste Abbaustufe von 17 $\beta$ -Östradiol ist, werden beide mit einer ähnlichen Geschwindigkeit abgebaut. Die Umwandlung von 17 $\beta$ -Östradiol zu Östron verzögert die Biodegradation offensichtlich nicht.
4. Die Entwicklung der Anzahl der Bakterienkolonien zeigt, dass ein Überleben während einer Lagerung ohne ständige Belüftung, Durchmischung oder Nährstoffzusätze über 56 Tage für einige Bakterienarten möglich ist. Pilze und Algen wurden nicht berücksichtigt, obwohl sie am Abbau von Östrogenen beteiligt sein können.
5. Da die Versuchsanstellungen einen unzureichenden Modellcharakter aufweisen, können die Ergebnisse nicht ohne Einschränkungen auf die Natur übertragen werden. Es kann aber geschlossen werden, dass die Biozönose im Flusswasser sowie im Belebtschlamm Östron und 17 $\beta$ -Östradiol biodegradieren kann. Die Reinigungsfähigkeit eines Flusses für Östrogene hängt also vor allem von dessen Keimgehalt und Biozönose ab. Die Wassertemperatur beeinflusst die Metabolisierungsaktivitäten, daher verläuft die Biodegradation in den Sommermonaten im Gegensatz zu den Wintermonaten beschleunigt.
6. Der Enzymimmunoassay ist geeignet, den Konzentrationsverlauf von Östron und 17 $\beta$ -Östradiol zu messen. Alle Proben, die zu einer Verlaufsuntersuchung gehören, sollten zusammen auf einer Platte untersucht werden, um Varianzen während des Verlaufs zu reduzieren.
7. Für die Messungen sind Dreifachbestimmungen geeignet. Zur Ausreißerkorrektur kann die Mittelung über den Medianwert erfolgen.
8. Bei Verlaufsuntersuchungen sollte auf eine Normierung bei der Kalibration verzichtet werden, um auch die äußeren Bereiche der Standardkurve korrekt erfassen zu können.
9. Exponentielle und doppelt exponentielle Funktionen können nur unzureichend an die gewonnenen Daten angepasst werden. Dagegen ist die logistische Funktion geeignet, den Daten angepasst zu werden.