



## **Abschlussbericht zum Projekt**

# **Evaluierung und Anwendung des Yeast-Estrogen-Screen (YES)-Assays für den summarischen Nachweis des Vorkommens und Abbaus von endokrinen Substanzen**

**Projektförderung**     **DVGW /**

**Innovationsfonds Klima- und Wasserschutz der badenova AG & Co. KG (Projektkoordination Arbeitsgemeinschaft Wasserwerke Bodensee-Rhein (AWBR))**

**Projektleitung**     **Dr. rer. nat. A. Tiehm**

**Projektbearbeitung**     **B.Sc. Annette Huber**  
**Dipl.-Ing. Stephan Mala**  
**Dipl.-Ing. (FH) Claudia Stoll**

**DVGW – Technologiezentrum Wasser (TZW),  
Abteilung Umweltbiotechnologie und Altlasten, Karlsruhe**

**Karlsruhe, 02. April 2014**

## **Danksagung**

Wir danken recht herzlich allen, die an der Bearbeitung und Durchführung des Forschungsvorhabens mitgewirkt haben. Frau Dr. Ing. Karin Gerhardy (DVGW HGF Bonn) und Herrn Dr. rer. nat. Daniel Petry (DVGW HGF Bonn) sowie Herrn Klaus Rhode (AWBR Geschäftsführung) gebührt Dank für die fachliche und organisatorische Begleitung des Vorhabens. An dieser Stelle vielen Dank für die Anregungen sowie die kritische Diskussion der Ergebnisse. Dieser Dank gilt auch den Projektsteuerungsgruppen W-GTK-1-3 Wassergüte und W-TK-1-2 Grundwasser und Ressourcenmanagement.

Ein Dankeschön geht an den Abwasserzweckverband Breisgauer Bucht für die Bereitstellung von Proben und seinem Interesse an den Projektfortschritten.

Einen speziellen Dank richten wir an den DVGW sowie die badenova AG & Co. KG, die durch die Projektförderung das Vorhaben erst ermöglichten.

Prof. John P. Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK) danken wir für die Bereitstellung der Hefezellen für das Forschungsvorhaben. Zuletzt möchten wir Prof. Dr. rer. nat. Henner Hollert (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Institut für Umweltforschung) danken, in dessen Abteilung die ersten Versuche mit der angepassten Standardarbeitsanweisung durchgeführt wurden.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Stand des Wissens	3
2.1. Endokrin wirksame Substanzen	3
2.2. Wirkung von endokrin wirksamen Substanzen	5
2.3. Endokrin wirksame Substanzen in der aquatischen Umwelt	6
2.4. Nachweis der endokrinen Wirkung	9
3. Material und Methoden	12
3.1. L-Yeast Estrogen Screen (L-YES)	12
3.2. Leuchtbakterienhemmtest	12
3.3. Chemisch-analytische Verfahren	14
3.4. Verwendete Modellsubstanzen	17
3.5. Abbauversuche	19
4. Etablierung des YES-Assays	21
4.1. Prinzip	21
4.2. Übertragbarkeit	23
4.3. Geräte und Verbrauchsmaterial	24
4.4. Medien und Lösungen	24
4.5. Kulturen	25
4.6. Durchführung des L-YES-Assay	26
4.7. Untersuchung von Modellsubstanzen	32
4.8. Prüfung von Matrixeffekten	35
4.9. Betrachtung der nominellen/reellen Konzentration im Assay	40
4.10. Praktische Hinweise zur Nutzung des L-YES-Assays	41
5. Untersuchung von Umweltproben mit erhöhter Konzentration	47
5.1. Kläranlage Breisgauer Bucht	48
5.2. Kläranlage Karlsruhe-Neureut	49
5.3. Weitere Kläranlagen	50
5.4. Diskussion	52
6. Aufkonzentrierung von Wasserproben	53
6.1. Methodik	54

6.2.	Chemische Analytik	56
6.3.	EEQ Bestimmung von aufdotierten Proben	57
6.4.	EEQ-Bestimmung von Proben aus der Kläranlage	58
6.5.	Diskussion	60
7.	Analyse von Oberflächenwasser, Uferfiltrat und Grundwasser	64
8.	Biologischer Abbau unter definierten Randbedingungen	66
8.1.	Bisphenol A	67
8.2.	2-Hydroxybiphenyl	70
8.3.	Natürliche Hormone (E1, E2 und E3)	71
8.4.	Synthetische Hormone (EE2 und MeEE2)	74
8.5.	Vergleich mit Literaturdaten	78
9.	Vergleich des L-YES mit dem Leuchtbakterienhemmtest	78
10.	Elimination der estrogenen Wirkung in der Kläranlage	80
11.	Gefährdungsanalyse und Risikoabschätzung	84
11.1.	Gefährdungsanalyse	85
11.2.	Risikoabschätzung	86
11.3.	Vergleichende Risikobewertung	92
11.4.	Maßnahmen zur Reduktion estrogener Substanzen	95
12.	Zusammenfassung	96
13.	Literatur	99

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Veröffentlichungen zu endokrin wirksamen Substanzen .....	1
Abb. 2	Vielfalt der endokrin wirksamen Substanzen.....	4
Abb. 3:	Eintragspfade von endokrin wirksamen Substanzen in Gewässer und Rohwasser.....	7
Abb. 4:	Strukturformeln der ausgewählten Modellsubstanzen .....	18
Abb. 5:	Anaerobbox und Inkubation der Ansätze in Anaerobgefäßen .....	21
Abb. 6:	Schema zur Detektion von estrogen wirksamen Substanzen mittels YES-Assay.....	22
Abb. 7:	Aufteilung der Mikrotiterplatten, Pipettierschema und ein grober Überblick zur Versuchsdurchführung des YES .....	27
Abb. 8:	Darstellung einer Dosis-Wirkungskurve .....	29
Abb. 9:	Darstellung von Dosis-Wirkungskurven zur Veranschaulichung von Top, Bottom und Hillslope .....	30
Abb. 10:	Darstellung dreier Dosis-Wirkungskurven mit unterschiedlichem Hillslope .....	31
Abb. 11:	Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Oberflächenwasserproben .....	36
Abb. 12:	Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Kläranlagenproben.....	40
Abb. 13:	Ergebnisse zur Untersuchung der nominellen/reellen Konzentration im YES-Assay.....	41
Abb. 14:	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in einem YES-Ansatz.....	42
Abb. 15:	Abweichungen von YES-Ergebnisse aufgrund variierender Zelldichte. ....	43
Abb. 16:	Darstellung mehrerer Kurvenverläufe von Modellsubstanzen aus repräsentativen Daten. Messung zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten. Punkte die nicht für die Ermittlung der Regressionskurve berücksichtigt wurden, sind schwarz dargestellt .....	44
Abb. 17:	Einfluss der Lagerung bei Oberflächenwasserproben (Dotierung von 1E-9 mol/L E2) .....	46
Abb. 18:	Schema einer SPE.....	55
Abb. 19:	Wiederfindungsraten nach der Aufkonzentrierung ausgewählter Substanzen mit verschiedenen Säulenmaterialien.....	57
Abb. 20:	Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung ausgewählter Substanzen mit der SDB-1 Säule.....	58

Abb. 21:	Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung von Zulauf und Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut.....	59
Abb. 22:	Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung von Zulauf und Ablauf einer süddeutschen Kläranlage.....	60
Abb. 23:	Zelldichte und Färbung der sieben getesteten Verdünnungsstufen der 20-fach aufkonzentrierten Probe eines Kläranlagenzulaufes .....	61
Abb. 24:	Aerober Abbau für BPA.....	67
Abb. 25:	Aerober Abbau für BPA.....	68
Abb. 26:	Aerober Abbau für 2-Hydroxybiphenyl .....	70
Abb. 27:	Abbau der natürlichen Hormone unter aeroben Bedingungen (BG = 0,1 µg/L) . .....	71
Abb. 28:	Abbau der natürlichen Hormone unter verschiedenen Redoxbedingungen ....	73
Abb. 29:	Abbau der synthetischen Hormone unter aeroben Bedingungen .....	75
Abb. 30:	Abbau der synthetischen Hormone unter verschiedenen Redoxbedingungen	77
Abb. 31:	Elimination der estrogenen Aktivität in der Kläranlage Breisgauer Bucht .....	81
Abb. 32:	Wasserkreislauf des Wasserversorgungssystems .....	85

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Ausgewählte Literaturdaten von endokrin wirksamen Substanzen in Kläranlagenzuläufen und -abläufen.....	8
Tab. 2:	Ausgewählte Literaturdaten zu E1 und E2 in Oberflächenwasserproben .....	9
Tab. 3:	Zeitlicher Verlauf der Gradientenelution der HPLC-DAD .....	14
Tab. 4:	Untere und obere BG sowie RT der Substanzen bei der Messung mittels HPLC-DAD .....	15
Tab. 5:	Kalibrierte Ionen und BG bei der Ionenchromatographie.....	17
Tab. 6:	Physikalische Eigenschaften der ausgewählten Modellsubstanzen (ChemIDplus lite oder *SRC 2011) .....	19
Tab. 7:	Untersuchte Modellsubstanzen und Konzentrationsbereiche .....	33
Tab. 8:	Mittelwerte der EC50-Werte, STABW und EEf der gemessenen Modellsubstanzen .....	33
Tab. 9:	Vergleich der ermittelten EC50-Werte der Modellsubstanzen mit Literaturdaten .....	34
Tab. 10:	Angabe der Dotierkonzentration und der entsprechenden EEQ <sub>berechnet</sub> .....	35
Tab. 11:	Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Oberflächenwasserproben .....	37
Tab. 12:	Ergebnisse der dotierten Proben der Kläranlage Breisgauer Bucht (unfil.: unfiltriert, fil.: filtriert).....	39
Tab. 13:	Ergebnisse für Proben der Kläranlage Breisgauer Bucht .....	48
Tab. 14:	Ergebnisse für Proben der Kläranlage Karlsruhe-Neureut.....	50
Tab. 15:	Ergebnisse für Proben weiterer Kläranlagen .....	51
Tab. 16:	Verwendete Festphasen .....	56
Tab. 17:	Blindwerte (EEQ in mol/L) nach der Aufkonzentrierung gemessen im L-YES-Assay .....	62
Tab. 18:	Überblick zur Durchführung der Anreicherung estrogener Stoffe verschiedener Publikationen .....	63
Tab. 19:	YES-Ergebnisse verschiedener Wasserproben .....	64
Tab. 20:	Ergebnisse der Oberflächengewässern aus dem YES-Assay und der chemischen Analytik .....	65
Tab. 21:	Übersicht Abbauversuche .....	66
Tab. 22:	Vergleich L-YES-Assay und chemische Analytik beim aeroben BPA-Abbau..	69
Tab. 23:	Vergleichende Untersuchung von Proben aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut auf endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (Glb) .....	79

Tab. 24:	Vergleichende Untersuchung von Proben aus den aeroben Abbauversuchen der Xenohormone hinsichtlich endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (Glb) .79
Tab. 25:	Vergleichende Untersuchung von Proben aus den aeroben Abbauversuchen der natürlichen und synthetischen Hormone hinsichtlich endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (Glb).....80
Tab. 26:	Gemessene EEQ in ng/L von Proben aus weiteren Kläranlagen.....82
Tab. 27:	Gesamt-Estrogenität verschiedener Kläranlagenproben als EEQ (Höchstwerte) .....89
Tab. 28:	Gesamt-Estrogenität verschiedener Umweltproben (Höchstwerte) .....91
Tab. 29:	Vergleich verschiedener Expositionspfade für Estrogene (EEQ).....93
Tab. 30:	Gesamt-Estrogenität verschiedener Lebensmittel als EEQ bzw. E2-Konzentration.....94
Tab. 31:	PNEC bzw. UQN in ng/L ausgewählter endokriner Disruptoren .....95



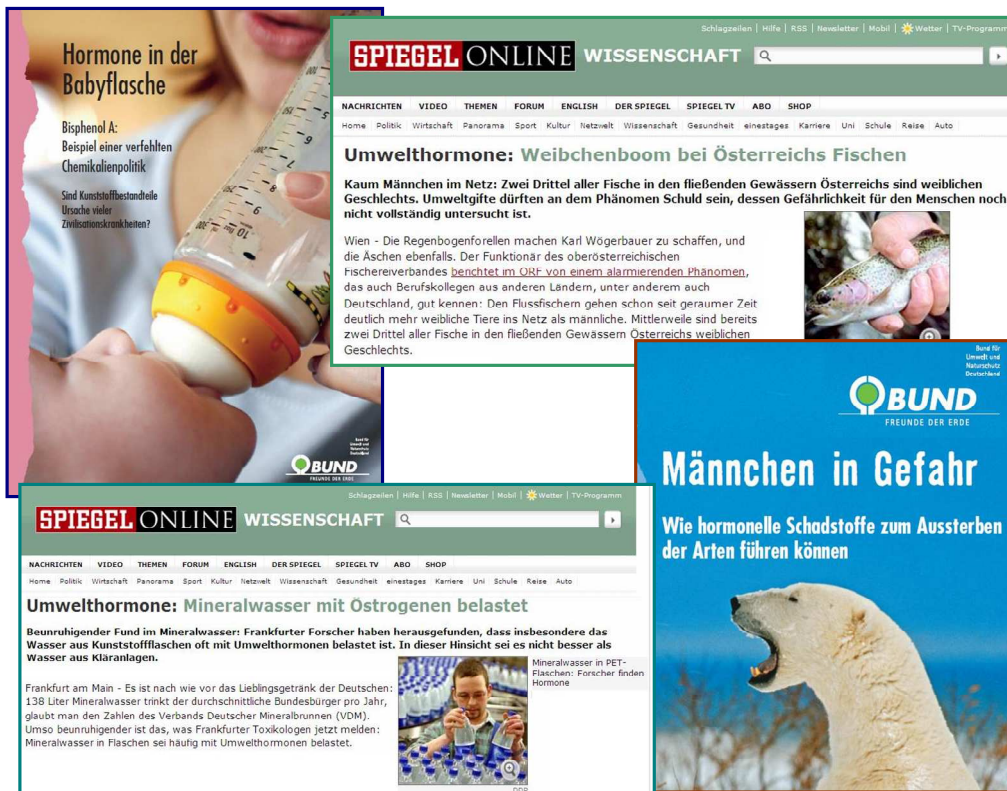
## Abkürzungsverzeichnis

BBP	Benzylbutylphthalat
BG	Bestimmungsgrenze
BPA	Bisphenol A
CPRG	Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
DAD	Dioden Array Detector
DO	Dropout Supplemente
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff, dissolved organic carbon
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -Estradiol
E3	Estriol
EC10	Effektkonzentration mit 10%iger Wirkung
EC20	Effektkonzentration mit 20%iger Wirkung
EC100	Effektkonzentration mit 100%iger Wirkung
EC50	Effektkonzentration mit halbmaximaler Wirkung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE2	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol
EEF	Estradiol-Äquivalentfaktor
EEQ	Estradiol-Äquivalentkonzentration
ERE	Estrogen empfindliche Region, estrogen responsive elements
ES	Endosulfan
FAO	Food and Agricultural Organisation, Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
fil.	filtriert
GC	Gaschromatographie
Glb	Wirkung gegenüber Leuchtbakterien, entspricht der niedrigsten getesteten Verdünnungsstufe, bei der die Hemmung der Biolumineszenz nach 30 min < 20% ist
2-HBP	2-Hydroxybiphenyl
hER	Menschlicher Estrogenrezeptor, human estrogen receptor
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, der Gemeinsame FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
kor.	korrigiert
LC50	Für 50% der Tiere letale Konzentration
LOEC	Lowest observed effect concentration, niedrigste Konzentration, bei der ein Effekt beobachtet wird
Log $K_{ow}$	Oktanol/Wasser-Koeffizient

MeEE2	Mestranol
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NOEC	No observed effect concentration; höchste Konzentration, bei der kein Effekt beobachtet wird
NP	Nonylphenol
OD	Optische Dichte (OD540nm: Optische Dichte bei 540 nm)
OP	4-tert.-Octylphenol
PNEC	Vorhergesagte nicht effektive Konzentration, predicted no effect concentration
Regr.	Regressionskurve
RQ	Risk quotient, Risikofaktor
RT	Retentionszeit, retention time
SPE	Solid phase extraction, Festphasenextraktion
STABW	Standardabweichung, standard deviation
SD	Synthetic dropout medium, Minimalmedium
TEF	Toxizitäts-Äquivalentfaktor
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff, Total organic carbon
UBA	Umweltbundesamt
unfil.	Unfiltriert
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
YES	Yeast Estrogen Screen; L-YES, L = Lytikase

# 1. Einleitung

Der zunehmende Nachweis von estrogen wirksamen Substanzen in der Umwelt und insbesondere im aquatischen Bereich führte zu einer intensivierten öffentlichen Wahrnehmung (siehe Abb. 1) Vor diesem Hintergrund besteht ein großes Interesse an belastbaren Wirtktests und einer Beurteilung der Qualität der Rohwässer der Trinkwasserversorgung.



**Abb. 1: Veröffentlichungen zu endokrin wirksamen Substanzen**

Der potenzielle Einfluss von Umweltchemikalien auf die Gesundheit und insbesondere auf das Hormonsystem von Mensch und Tier ist wissenschaftlich belegt. Endokrin aktive Substanzen führen bei Wildtieren zu Entwicklungsstörungen, Geschlechterverschiebungen und Reproduktionsstörungen (Schultis, 2005). Auch beim Menschen werden ein Rückgang der Spermienzahl sowie ein Anstieg von Brust- und Hodenkrebs der Wirkung von endokrin aktiven Substanzen zugesprochen (Beresford et al., 2000; Schultis, 2005).

Die Belastung von Gewässern mit Schadstoffen wird derzeit vorwiegend anhand chemisch-analytischer Parameter beurteilt. Die chemisch-analytische Überwachung erfolgt dabei vor dem Hintergrund, mögliche Gesundheitsgefährdungen frühzeitig zu erfassen, wobei die

Aussagesicherheit durch die Auswahl der analysierten Substanzen begrenzt wird. Der derzeitige Kenntnisstand über das Vorkommen, die Persistenz und den Verbleib endokrin wirksamer Verbindungen in der aquatischen Umwelt ist lückenhaft.

Ein deutlich erweitertes Substanzspektrum kann durch biologische Wirktests erfasst werden, die allerdings in der Regel geringere Empfindlichkeiten aufweisen als die chemische Analytik. Der Vorteil biologischer Wirktests liegt darin, dass direkt die Substanzen nachgewiesen werden, die zu gesundheitsschädlichen Wirkungen führen können. Dabei werden auch Substanzen erfasst, die nicht in chemischen Monitoring-Programmen zum Gewässerschutz enthalten sind bzw. für die noch kein analytisches Nachweisverfahren kalibriert ist.

Vor diesem Hintergrund sollte ein endokriner Wirktest (YES-Assay) am Technologiezentrum Wasser etabliert und validiert werden. Beim YES (Yeast-Estrogen-Screen)-Assay handelt es sich um ein relativ einfach durchzuführendes *in vitro* Testverfahren. Die im Bericht dokumentierten Untersuchungen hatten u.a. ein besseres Verständnis der Verbreitung von endokrin wirksamen Verbindungen in der aquatischen Umwelt und ihres Abbauverhaltens zum Ziel.

Das Vorkommen biologisch wirksamer Substanzgemische in Oberflächenwasser mit unterschiedlicher Belastung durch Abwassereinleitung, in der Uferfiltration und im Grundwasser sollte bestimmt werden. Dabei wurden Probenahmen oberstromig und unterstromig von Kläranlagen sowie vor und nach der Uferfiltration durchgeführt. Die Monitoring-Daten dienen zur Bestandsaufnahme der Verbreitung estrogen wirksamer Substanzen. Zusätzlich wurden die Abbauprozesse in Abhängigkeit der Randbedingungen untersucht. Die Abbaueffizienz endokriner Substanzen mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, Eisen(III) und Sulfat wurde beurteilt. Vergleichend wurden die chemische Analytik und Messungen mit dem Leuchtbakterienhemmtest durchgeführt. Verfahren zur Aufkonzentration der Proben wurden geprüft. Folgende Arbeitspakete (AP) wurden bearbeitet:

- (1) Fortlaufende Aktualisierung des Wissensstandes aus der Literatur
- (2) Etablierung des YES-Assays zum Nachweis von estrogen wirksamen Substanzen
- (3) Analyse von Umweltproben, in denen erhöhte Werte zu erwarten sind
- (4) Evaluierung von Methoden zur Anreicherung von Wasserproben
- (5) Analyse von Wasserproben aus Oberflächengewässern, der Uferfiltration sowie von Grundwasser
- (6) Biologischer Abbau von endokrinen Substanzen unter definierten Bedingungen

- (7) Ermittlung der Elimination in Proben aus Oberflächengewässern, Kläranlagen und der Uferfiltration
- (8) Gefährdungsanalyse und Risikoabschätzung
- (9) Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines praktikablen biologischen Nachweisverfahrens, das die chemische Analytik ergänzen kann. Es sollte aus Sicht des Ressourcenschutzes für die Wasserversorgung beurteilt werden, unter welchen Randbedingungen ein biologischer Abbau der endokrinen Substanzen zu erwarten ist, und wann Kontaminationen des Rohwassers auftreten können. Die Ergebnisse wurden vergleichend zusammengefasst und den Gremien des DVGW regelmäßig vorgestellt.

## **2. Stand des Wissens**

### **2.1. Endokrin wirksame Substanzen**

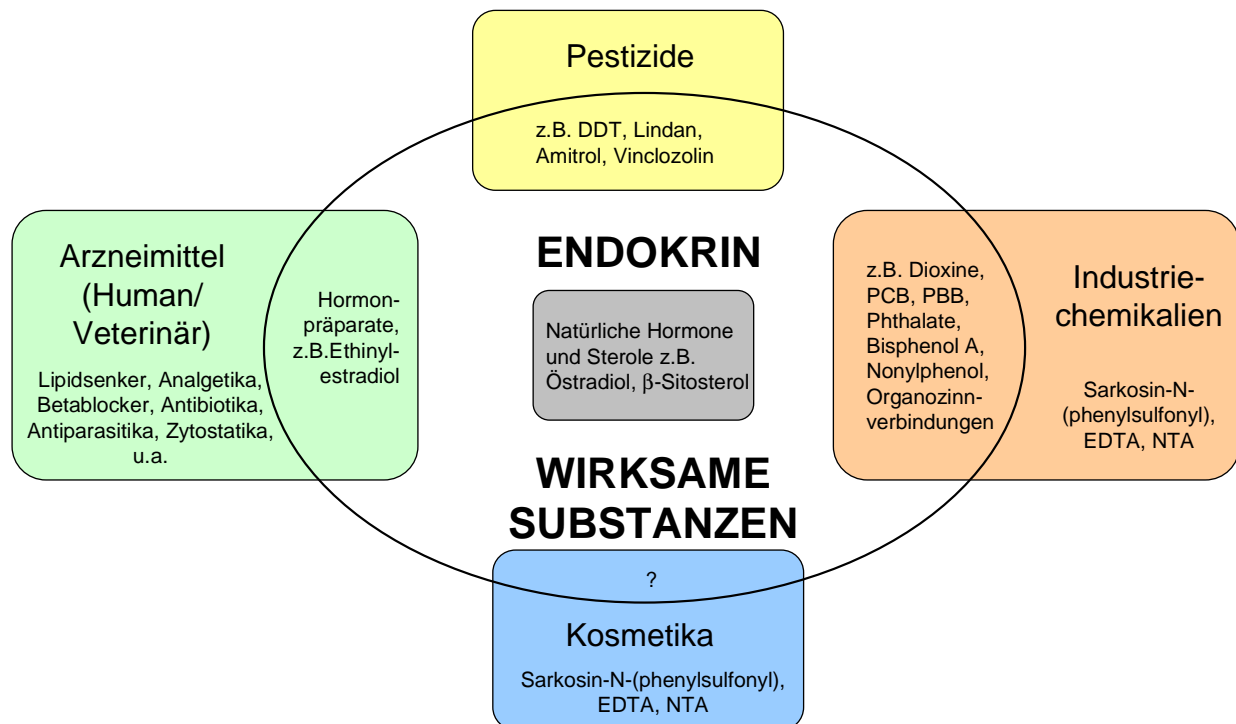
In den vergangenen Jahren ist die Beeinflussung bzw. Störung des hormonellen Systems bei Mensch und Tier durch Umweltchemikalien in den Blickpunkt der Wissenschaft und auch der Öffentlichkeit gerückt. Als Ursache wurden chemische Substanzen erkannt, die sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sind. Diese Stoffe bezeichnet man als endokrine Disruptoren oder endokrin wirksame Substanzen. Per Definition der Europäischen Union ist ein endokriner Disruptor eine exogene Substanz oder eine Substanzmischung, die als Folge von Veränderungen der endokrinen Funktionen schädliche gesundheitliche Wirkungen in einem intakten Organismus, seiner Nachkommenschaft oder im Tierbestand auslösen (Europäische Kommission, 2011).

Es handelt sich also um Stoffe, die mit der Produktion, der Freisetzung, dem Transport und Abbau, der Bindung an Rezeptoren und der Wirkung oder Eliminierung von natürlichen Hormonen interferieren, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind (Kavlock et al., 1996). Dies umfasst nicht nur Verbindungen, die wie körpereigene Hormone wirken können (agonistisch), sondern auch Verbindungen, die die Wirkung der körpereigenen Hormone abschwächen (antagonisieren) können (Mueller et al., 2003). Etwas drastischer formuliert sind endokrine Disruptoren exogene Substanzen oder Gemische, welche die Funktion des endokrinen Systems verändern, und damit nachteilige gesundheitliche Effekte in einem gesunden Organismus oder dessen Nachkommen hervorrufen (Schlumpf, 2002). Außerdem kann in der Gruppe der endokrinen Disruptoren zwischen estrogenen und androgenen Wirkung unterschieden werden. Estrogene Wirkung besitzen die vorwiegend weiblichen

Geschlechtshormone wie beispielsweise  $17\beta$ -Estradiol, landläufig auch Estrogen genannt. Eine androgene Wirkung dagegen besitzen die vorwiegend männlichen Geschlechtshormone wie beispielsweise Testosteron (Escher et al., 2008a).

Unter die Bezeichnung endokrine Disruptoren fallen sehr heterogene Substanzen mit einem weiten Spektrum an struktureller Diversität und Potenz (Fang et al., 2000). Es kann zwischen natürlichen Hormonen und Xenohormonen, d.h. nicht natürlich vorkommenden Substanzen mit hormoneller Wirkung, unterschieden werden. Unter die Gruppe der Xenohormone fallen sowohl Pharmaka, deren estrogene Wirkung gezielt genutzt wird, als auch Industriechemikalien, deren estrogene Wirkung einen unerwünschten Nebeneffekt darstellt (siehe Abb. 2). Vertreter solcher Substanzen lassen sich unter den Kontrazeptiva (Ethinylestradiol), Pestiziden (Methoxychlor, Dichlorodiphenyl-trichloroethan-Derivate), Weichmachern (Phthalate), Kunststoffen (Bisphenol A), Tensiden (Alkylphenole und Derivate) und Antifouling-Anstrichen (Organozinn-Anstriche) finden.

Als wichtiges Beispiel ist hier Bisphenol A (BPA) zu nennen. Die Nutzung dieser Ausgangschemikalie zur Herstellung von Kunststoffbabyflaschen wurde aufgrund seiner estrogenen Aktivität verboten (BMELV, 2011). Des Weiteren können auch Kosmetika und Pestizide auf das endokrine System wirken.



**Abb. 2** Vielfalt der endokrin wirksamen Substanzen

Im Jahr 2000 beauftragte das Europäische Parlament die Europäische Kommission mit der Identifizierung von endokrinen Disruptoren. Diese werden seither in einer Datenbank zusammengestellt (EC, 2011).

## 2.2. Wirkung von endokrin wirksamen Substanzen

Die Substanzen können in die Sexualhormonsysteme, aber auch in den Schilddrüsenhormonkomplex eingreifen (Brouwer, 1998). Einerseits ist es möglich, dass die Stoffe eine direkte rezeptorvermittelte (volle und partielle Agonisten, kompetitive Antagonisten) Wirkung besitzen, andererseits können die Substanzen über die Veränderung der Biosynthese oder des Metabolismus der natürlichen Hormone einen indirekten Effekt auf das Hormonsystem haben. Die endokrinen Disruptoren können aber auch durch ihre Wirkung im weiblichen und männlichen Sexualhormonsystem unterschieden werden. Entsprechend der Wirkung erfolgt eine Einteilung in estrogenartig, antiestrogenartig, androgenartig und antiandrogenartig wirksame Substanzen. Substanzen mit einer rezeptorvermittelten estrogenartigen Wirkung sind am häufigsten bekannt. Diese Chemikalien können an den Estrogenrezeptor binden und dadurch Wirkungen der natürlichen Estrogene nachahmen.

In der Vergangenheit wurde über eine Vielzahl von Auswirkungen auf das Reproduktionssystem wildlebender Tiere berichtet. Neben der Feminisierung von männlichen sowie einer Vermännlichung von weiblichen Tieren treten hauptsächlich Fertilitätsstörungen, Stoffwechselanomalien und Verhaltensstörungen, ein geringer Bruterfolg sowie eine Veränderung des Geschlechterverhältnisses von Wildtieren auf (Schultis, 2005). Die beobachteten Effekte zeigen aber im Gegensatz zu akut toxischen Effekten Besonderheiten in der Wirkweise. Dies sind insbesondere die niedrigen Wirkkonzentrationen, das Auftreten zeitlicher Sensibilitätsfenster (z.B. während altersabhängiger Reifeprozesse), verzögerte Wirkung z. T. über Generationen und Irreversibilität der Wirkung (Servos et al., 2005).

Negative Effekte einer endokrinen Belastung konnten bei einigen Invertebraten (z. B. Matthiessen und Gibbs, 1998; Zou und Fingerman, 1999) sowie in allen Wirbeltierklassen nachgewiesen werden. So wurden beispielsweise Verweiblichungsphänomene wie die Induktion der Synthese von Vitellogenin in männlichen Fischen verursacht durch natürliche und synthetische Steroide und Alkylphenole beobachtet (Purdom et al., 1994; Harries et al., 1997). Vitellogenin ist ein in der Leber von weiblichen oviparen Vertebraten produziertes Lipoglykophosphoprotein, welches die Vorstufe von Dotterproteinen darstellt (Norberg und Haux, 1985). Es wurde nachgewiesen, dass Tributylzinn bei Weichtieren (Mollusken) zu einer Hemmung der Aromatase, die für die Umwandlung von Testosteron zu 17 $\beta$ -Estradiol

(E2) zuständig ist, führt. Durch die Hemmung der Steroidbiosynthese kommt es zu einer Anhäufung von Testosteron, die Folge ist ein androgener Effekt (Tyler et al., 1998). Ein weiteres Beispiel ist der Rückgang von Alligatorpopulationen aufgrund von Störungen im Reproduktionssystem der männlichen Alligatoren nach der Belastung des Gewässers mit Pestiziden wie o,p- Dichlordiphenyltrichlorethan oder Dicofol (Guillette et al., 1994 und 1995). Das sind nur einige Beispiele für die Auswirkungen von endokrin wirksamen Substanzen in der Umwelt.

Neben Auswirkungen auf die Tierwelt gibt es auch Anzeichen möglicher hormonell bedingter Wirkungen auf den Menschen. Untersuchungen konnten belegen, dass menschliche Nahrung und vereinzelt auch Trinkwasser estrogen wirksame Substanzen beinhaltet (Fritsche et al., 1999; Holtney-Weber, 2000; Heemken et al., 2001). Diese Substanzen werden in Zusammenhang mit einer verringerten Spermienzahl und -mobilität bei Männern (Beresford et al., 2000; Schultis, 2005; Sharpe et al., 1993; Toppari et al., 1996) und einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei Frauen (Safe, 1997; Wolff et al., 1993) gebracht.

Endokrin wirksame Substanzen weisen nach Schrenk-Bergt et al. (1999) keine einheitliche chemische Struktur auf, so dass das Vorhersagen endokriner Aktivität anhand der Struktur derzeit nicht möglich ist. Etwa 150 Chemikalien wurden verdächtigt, Störungen des Hormonsystems auszulösen (Bursch et al., 1998). Andere Schätzungen gingen von etwa 70.000 Substanzen mit potentieller endokriner Wirksamkeit aus (Gillesby et al., 1998).

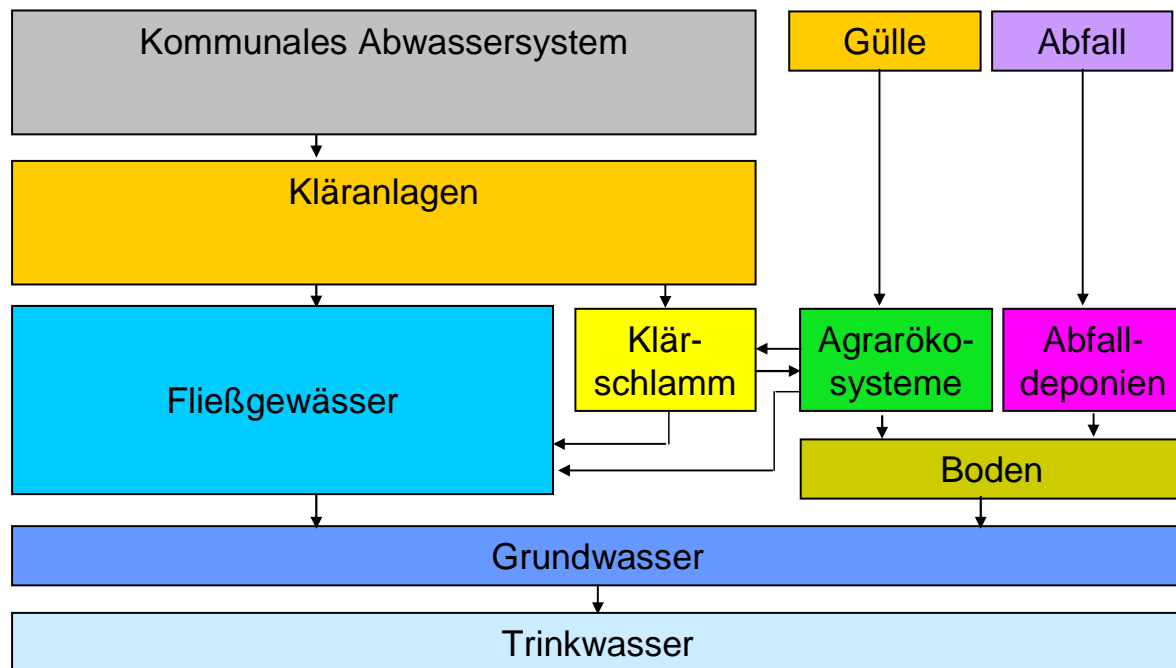
Aufgrund der Vielfalt der Substanzen, die eine endokrine Wirkung aufweisen, und wegen ihres häufigen Einsatzes, ist eine weite Verbreitung in der Umwelt zu erwarten. Man kann davon ausgehen, dass prinzipiell alle lebenden Organismen hormonell wirksamen Substanzen direkt oder indirekt ausgesetzt sind (Maczka et al., 2000). Eine Exposition kann durch Aufnahme über Nahrung und Wasser, das Einatmen belasteter Luft oder durch Kontakt mit Boden, Sediment oder Wasser gegeben sein. Eine besondere Rolle spielt dabei die aquatische Umwelt (Kloas et al., 2000), weshalb aquatische Organismen und Tiere, welche sich von wasserlebenden Organismen ernähren, von einer endokrinen Belastung besonders betroffen sind.

### **2.3. Endokrin wirksame Substanzen in der aquatischen Umwelt**

Die Eintragungspfade in die Umwelt können vielfältig sein. Abb. 3 zeigt schematisch mögliche und beschriebene Quellen und Verteilungswege. Haupteintragungspfad in die aquatische Umwelt sind kommunale Abwässer (Baronti et al., 2000; Klaus et al., 2008). Jedoch können auch Bodenbelastungen aus der Landwirtschaft (Combalbert, 2010) und Abfallablagerungen (Kang et al., 2006), die sich über Abschwemm- oder Auswaschungsvorgänge in Oberflächen-



gewässer oder in das Grundwasser verlagern können, Quelle für erhöhte Konzentrationen an endokrinen Disruptoren in der Umwelt sein.



**Abb. 3: Eintragungspfade von endokrin wirksamen Substanzen in Gewässer und Rohwasser**

Der Haupteintrag von endokrinen Disruptoren ist aber auf menschliche sowie tierische Ausscheidungen und Industrieabwässer zurückzuführen. So sind Kläranlagen einschließlich der entsprechenden Klärschlämme Belastungsschwerpunkte für endokrin wirksame Verbindungen. Während des Klärprozesses werden die Verbindungen meist nur unvollständig eliminiert und gelangen so über Kläranlagenabflüsse in die Oberflächengewässer – teilweise sogar noch in ökologisch relevanten Konzentrationen. Aus diesem Grund liegt hier die größte Quelle von natürlichen und synthetischen Estrogenen in der aquatischen Umwelt (Baronti et al., 2000). Die bisherigen Untersuchungen zu endokrin wirksamen Substanzen in Kläranlagenzu- und abläufen ergaben, dass die gefundenen Konzentrationen abhängig vom Untersuchungsort und -zeitpunkt sehr unterschiedlich sind (siehe Tab. 1).

**Tab. 1: Ausgewählte Literaturdaten von endokrin wirksamen Substanzen in Kläranlagenzuläufen und -abläufen**

Substanzgruppen	Substanz	Kläranlagen-zulauf in ng/L	Kläranlagen-ablauf in ng/L	Land	Referenz	
Phenole	4-Nonylphenol	<10-10186	<10-14444	Deutschland	Höhne et al., 2008	
		41,5	12,6	Korea	Nam et al., 2014	
		82000	12000	Spanien	Petrovic et al., 2001	
		57640	650	Spanien	Planas et al., 2002	
		10000	1000	Japan	Onda et al., 2003	
		2720-25000	320-3210	Kanada	Lee et al., 2005	
	Bisphenol A	24791,6	4292,6	China	Jin et al., 2008	
		<20-12205	<20-7625	Deutschland	Höhne et al., 2008	
		88	19	Korea	Nam et al., 2014	
		10000-37000	n.d.-2500	Österreich	Fürhacker et al., 2000	
		193-2440	31-223	Kanada	Lee et al., 2000	
		550	140	Japan	Onda et al., 2003	
4-tert.-Octylphenol	210-2400	20-450	Kanada	Lee et al., 2005		
	39-1495	<13-392	Deutschland	Höhne et al., 2008		
	3900	1200	Spanien	Petrovic et al., 2001		
	380-3560	10-470	Kanada	Lee et al., 2005		
	Natürliche Steroide	17β-Estradiol	10-176	1-6	USA	Chimchirian et al., 2007
			12,2-19,5	<1	Deutschland	Andersen et al., 2003
11			1,6	Italien	D'Ascenzo et al., 2003	
37			0,8	Japan	Onda et al., 2003	
4,9-11			<0,5-1,0	Deutschland	Joss et al., 2004	
2,4-26			0,2-14,7	Kanada	Servos et al., 2005	
3-22			<1-2	Kanada	Lee et al., 2005	
21,4			4,4	China	Jin et al., 2008	
51-86			5-54	USA	Chimchirian et al., 2007	
Estron		54,9-76,6	<1	Deutschland	Andersen et al., 2003	
		44	17	Italien	D'Ascenzo et al., 2003	
		51	16	Japan	Onda et al., 2003	
		7,3-75	0,5-8,6	Deutschland	Joss et al., 2004	
		19-78	1-96	Kanada	Servos et al., 2005	
		8-52	<1-54	Kanada	Lee et al., 2005	
		38,6	12,6	China	Jin et al., 2008	
		76-292	2-5	USA	Chimchirian et al., 2007	
		72	2,3	Italien	D'Ascenzo et al., 2003	
Estriol	580	3,6	Japan	Onda et al., 2003		
	53,9	<7,5	China	Jin et al., 2008		
	Synthetische Steroide	17α-Ethinyl-estradiol	1,4	1,1	USA	Chimchirian et al., 2007
		6,2-10,1	<1	Deutschland	Andersen et al., 2003	
		0,7-5,2	<0,5	Deutschland	Joss et al., 2004	
Phytoestrogene	Enterolactone	581-2111	>99%	Australien	Kang et al., 2009	
		Daidzein	341-1688	>99%	Australien	Kang et al., 2009
		-	10	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
	Enterodiol	75-120	7-16	Italien	Laganà et al., 2004	
		60-834	>99%	Australien	Kang et al., 2009	
		-	60-90	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
	β-Sitosterol	-	380-560	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
		-	20-30	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
		10	3-10	Italien	Laganà et al., 2004	
	Stigmasterol	-	80-110	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
		-	50-300	Deutschland	Pawlowski et al., 2003	
		-	3-5	Italien	Laganà et al., 2004	
	Cholesterol	8-18	3-5	Italien	Laganà et al., 2004	
195-384		15-83	Italien	Laganà et al., 2004		
-		80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
Biochanin A	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
Genistein	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
Campesterol	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		
	-	80-94	Deutschland	Pawlowski et al., 2003		

In verschiedenen Ländern wurden Estrogene im Oberflächenwasser nachgewiesen. Für Estron (E1) und E2 sind Werte bis zu 20,1 ng/L bzw. 29,1 ng/L beschrieben worden (siehe Tab. 2).

**Tab. 2: Ausgewählte Literaturdaten zu E1 und E2 in Oberflächenwasserproben**

Probe	E1 in ng/L	E2 in ng/L	Land	Literaturquelle
Oberflächengewässer	< 1 – 20,1	<1 – 29,1	Deutschland	Wenzel et al., 1998
	0,84-17,8	<BG	China	Zhang et al., 2014
	max. 2,5	max. 4,5	Deutschland	Kalbfus, 1998
Fluss	max. 1,6	n.n.	Deutschland	Ternes et al., 1999
Fluss	8,0	n.n.	Spanien	Petrovic et al., 2001
Fluss, See	max. 6,0	n.n.	Deutschland	Wegener et al., 1999
See		max. 2,67	USA	Snyder et al., 1999
Fluss, Kanal, Küste	max. 3,4	max. 5,5	Niederlande	Belfroid et al., 1999
		max. 1,28	USA	Snyder et al., 1999
Teich (Viehweide)		max. 1,8	USA	Irwin et al., 2001
Teich (Viehweide)		max. 0,78	USA	Irwin et al., 2001
Teich (Bot. Garten)		max. 0,24	USA	Irwin et al., 2001

Besonders dort, wo zur Trinkwassergewinnung Oberflächenwasser oder durch Oberflächenwasser beeinflusstes Grundwasser verwendet wird, sind Trinkwasserkontaminationen durch endokrin wirksame Substanzen möglich (Schmidt et al., 2000).

Biologische, chemische und physikalische Prozesse – wie z.B. biologischer Abbau, chemische Transformation, Sorption, Dispersion und Diffusion – führen zu einer Minderung der endokrin wirksamen Substanzen in der Umwelt. Zu den wichtigsten physikalischen Prozessen bei der Minderung von endokrinen Disruptoren gehören Photodegradation, Verdunstung und Sorption (Jürgens et al., 1998). Neben den physikalischen Prozessen ist die biologische Schadstoffminderung von besonderer Bedeutung, da sie im Gegensatz zu Umverteilungsprozessen wie Sorption und Disperion zu einer absoluten Abnahme der Schadstofffracht führt.

## 2.4. Nachweis der endokrinen Wirkung

Um endokrin wirksame Substanzen in Spurenkonzentrationen in Umweltproben chemisch-analytisch detektieren und quantifizieren zu können, sind sehr empfindliche instrumentelle Nachweismethoden erforderlich. Aufgrund der strukturellen Vielfalt bekannter hormonaktiver Substanzen ist aber eine auf theoretischer Basis getroffene Voraussage einer möglichen hormonellen Aktivität von Substanzen sehr schwierig. Gründe hierfür sind zum einen die große Anzahl an Möglichkeiten, wo sie in das Hormonsystem eingreifen können, und zum anderen das Zusammenspiel synergistischer und antagonistischer Wirkungsmechanismen von Substanzgemischen. Dies bedeutet, dass nur Substanzen mit bekanntem endokrinem

Potenzial mittels chemisch-analytischer Verfahren erfasst werden können. Um die endokrine Aktivität von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen in Umweltproben ermitteln zu können, wurden deshalb sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Testsysteme entwickelt. Im Folgenden sind einige der gebräuchlichsten Testsysteme beschrieben.

Die klassischen *in vivo* Studien werden an terrestrischen Vertebraten wie Mäusen, Ratten, Vögeln durchgeführt. Den Testorganismen wird die zu testende Substanz entweder injiziert oder über das Futter verabreicht. Gemessen werden z. B. die Zu- oder Abnahme des Uterus-Nassgewichtes ovariectomierter oder juveniler Mäuse (Shelby et al., 1996) oder die Verhornung des Vaginalepithels von Ratten (Odum et al., 1997) nach Verabreichung der Testsubstanz. Diese Testmethoden wurden erfolgreich für den Nachweis von (anti-)estrogenen und (anti-)androgenen Wirksamkeiten eingesetzt. Es bleibt aber offen, welche Relevanz die Substanzen in Bezug auf Organismen der aquatischen Umwelt haben. In *in vivo* Studien an aquatischen Organismen wie z.B. der Regenbogenforelle kann neben der Fütterung mit endokrinen Substanzen (Tremblay et al., 1998) auch die Exposition über das Wasser (Jobling et al., 1995) analysiert werden. Als Messparameter können das Nassgewicht der Gonaden, die Plasma-Steroidkonzentration, die Ausbildung von Imposex (Entwicklung von Geschlechtsorganen, die gegensätzlich zu dem eigentlichen Geschlecht sind) oder die Bildung des Eidottervorläuferproteins Vitellogenin dienen (Wahli et al., 1981). Dieses Protein wird normalerweise nur von weiblichen Fischen gebildet, eine Bildung beim Männchen gilt daher als deutliches Zeichen einer endokrinen Wirkung.

Aus Gründen des Tierschutzes werden *in vivo* Test immer mehr durch *in vitro* Methoden ersetzt. *In vitro* Assays sind im Allgemeinen einfacher in der Durchführung, weniger zeitaufwendig und kostengünstiger als *in vivo* Versuche. Diese Aspekte zusammen mit der Tatsache, dass ein wesentlich geringeres Probenvolumen ausreicht, machen deutlich, warum *in vitro* Testsysteme besser für Untersuchungen mit hohem Probendurchsatz geeignet sind als *in vivo* Systeme, auch wenn die *in vitro* Verfahren in der Regel nicht die Kompensations- und Regulationsmöglichkeiten eines vollständigen Organismus besitzen (Beresford et al., 2000). Diese Assays repräsentieren nur einen kleinen Anteil des metabolischen Systems eines ganzen Tieres und können deshalb kein Modell für die Wirkung der Biokonzentration und Bioakkumulation oder die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Aspekte sein. Die *in vitro* Biotests stellen aber ein wirkungsvolles Instrument zur grundsätzlichen Erfassung von hormonaktiven Stoffen dar, und erlauben damit weitgehendere und summarische Aussagen, die über die rein chemische Analytik hinausgehen (Ankley et al., 1998; Desbrow et al., 1998).

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von *in vitro* Testverfahren zur Ermittlung einer endokrinen Wirksamkeit vorgeschlagen: Verschiedene Tests zur kompetitiven Liganden-

bindung (Gorski et al., 1974), Zellproliferation (MCF-7-Assay, Soto und Sonnenschein, 1985), endogene Proteinexpression oder Enzymaktivität (Hepell et al., 1995), rekombinante Rezeptor/ Reporter Assays (Balaguer et al., 1996; Gillesby et al., 1997; Zacharewski et al., 1995), sowie auf rekombinanten Hefezellen und Zelllinien basierende Assays wie z. B. der E-Screen (Arnold et al., 1996).

Da sich ein Großteil der hormonaktiven Substanzen der Gruppe der Estrogene bzw. Pseudoestrogene zuordnen lässt, wurden vornehmlich *in vitro* Biotests zum Nachweis estrogener Aktivität entwickelt (Arnold et al., 1996, Routledge et al., 1996).

Häufig werden als *in vitro* Tests Proliferations-Assays verwendet. Hierbei wird die Zunahme oder Abnahme der Zellzahl einer hormonabhängigen Zellkultur gemessen. Besonders erwähnenswert ist hier der E-Screen Assay. Bei diesem Assay wird die estrogenabhängige Proliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 gemessen (Soto et al., 1995). Nach der Bindung eines Liganden an den Estrogenrezeptor kommt es zu einer Zunahme der Proliferation. Als Maß für die estrogen Wirkung einer Substanz oder einer Umweltprobe wird die Zellproliferation im Vergleich zu Kontrollen mit und ohne E2 bestimmt. Mit einem vereinfachten und miniaturisiertem E-Screen analysierten Körner et al. (1998,1999) die Zu- und Abflussbalance von estrogen aktiven Verbindungen in einem Klärwerk.

Neben der Proliferation von Zellkulturen wird auch die hormonabhängige Bildung von Proteinen in Zellkulturen gemessen (Kloas et al., 1999; Smeets et al., 1999). Meist handelt es sich um Primärzellen aus hormonsensitiven Geweben wie z. B. Fisch- oder Froschleber. In diesen Zellen führt die Bindung eines Liganden an den Rezeptor zur Expression eines spezifischen Genes. Als spezifische Proteine werden meist Vitellogenin sowie der Estrogenrezeptor bestimmt. Die gebildete messenger Ribonukleinsäure wird mittels Polymerasekettenreaktion oder Northern-Blot Analyse, das Protein via ELISA oder Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Ob eine Substanz an den Estrogenrezeptor bindet, kann auch mittels Rezeptorbindungsstudien untersucht werden. Diese Studien werden häufig an zellfreien Extrakten aus verschiedenen rezeptorreichen Geweben (z.B. Leber, Uterus oder Prostata) durchgeführt. Bestimmt wird die Stärke der Bindung einer Substanz an den Rezeptor. Diese Affinität wird meist indirekt über die Verdrängung eines isotoopenmarkierten oder fluoreszierenden Liganden vom Rezeptor durch die Substanz ermittelt (Klotz et al., 1996). Ob eine Substanz nach Bindung aber auch rezeptorvermittelte Genantworten auslöst, kann dieser Test nicht beantworten.

Eine weitere häufig eingesetzte *in vitro* Testmethode stellen Reporter Assays dar. Dabei handelt es sich um Zelllinien wie z.B. die MCF-7-Linie oder Hefezellen, in deren Erbgut ein Plasmid mit der Information für den menschlichen Estrogenrezeptor sowie ein Reporter Gen

(z.B. Gen, das für ein farbstoffumsetzendes Enzym kodiert), gentechnisch eingebracht wurde. Als Maß für die estrogenische Wirkung einer Testsubstanz dienen Farbumschlag oder Leuchten, die durch die Aktivierung des Estrogenrezeptors und der damit verbundenen Synthese des Reporter-Enzyms hervorgerufen werden. Die zwei bekanntesten Reporter-Gen-Assays sind der 293-ER-Luc Assay und der YES-Assay. Beim 293-ER-Luc-Assay werden veränderte menschliche embryonale Nierenzellen der Linie 293 (293 HEK-Zellen – human embryonic kidney cells) verwendet. Diese wurden mit einem Expressionsplasmid, das die DNA-Sequenzen des menschlichen Estrogenrezeptors  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$ ) enthält, transfiziert (Kuiper et al., 1998; Meerts et al., 2001). Als Reporterenzym dient die Luciferase, deren Aktivität nach Zugabe des Substrates Luciferin über Leuchten nachgewiesen wird (Meerts et al., 2001).

Einige dieser Bioassays wurden bereits in einer Studie von Mitgliedern der Global Water Research Coalition zur Messung von Umweltproben evaluiert und angewandt, sowie ihre Vor- und Nachteile diskutiert (GWRC, 2008). Die Nachteile der bisher genannten *in vitro* Testmethoden, die meist auf der Verwendung von menschlichen Zelllinien beruhen, sind vor allem die schwierige und zeitaufwendige Handhabung/Pflege der Zellen und der damit verbundene Kostenaufwand. Zellkulturen sind anfällig für Kontaminationen und reagieren sehr empfindlich auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Aus diesen Gründen muss bei den Arbeiten auf höchste Sterilität geachtet werden, und das Labor muss über eine spezielle, kostenintensive Ausstattung verfügen. Ein weiterer kritischer Punkt bei Zellkulturverfahren ist sowohl die genetische als auch die phänotypische Instabilität der Zelllinien. Deshalb erscheint der YES-Test, der auf dem Einsatz von modifizierten Hefezellen beruht, unter praktischen Gesichtspunkten besonders vorteilhaft.

### **3. Material und Methoden**

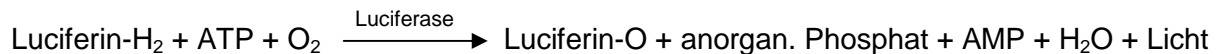
#### **3.1. L-Yeast Estrogen Screen (L-YES)**

siehe Kapitel 4. „Etablierung des YES-Assays“.

#### **3.2. Leuchtbakterienhemmtest**

Zur Untersuchung der Toxizität von Wasserproben wurde der Leuchtbakterienhemmtest mit dem marinen Bakterium *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterium) nach DIN EN ISO 11348-3-L53 (2009) durchgeführt. Leuchtbakterien senden als Produkt ihres Stoffwechsels ein kaltes

Leuchten (Biolumineszenz) aus. Der Leuchtvorgang ist ein aerober Oxidationsprozess und stellt einen Nebenweg der Atmung dar, der nicht zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), sondern zur Anregung einer Intermediarverbindung führt, die Licht aussendet. Das Reaktionssubstrat ist das Luciferin, welches in Anwesenheit von Wasser, Sauerstoff und unter Mitwirkung von ATP durch Vermittlung des Enzyms Luciferase oxidiert wird. Durch Phosphatabspaltung von ATP entsteht außerdem Adenosinphosphat (AMP).



Bei dieser Reaktion werden 80-95 % der chemischen Energie in Form von Licht freigesetzt. Der für die bakterielle Lumineszenz verantwortliche Stoffwechselweg ist Bestandteil der Elektronentransportkette. Durch die Messung der Lumineszenz wird indirekt der Fluss der Elektronen in der Atmungskette und der metabolische Zustand der Zelle bestimmt. Diese Biolumineszenz ist abhängig von einem ungestörten Stoffwechsel. Toxizitätsparameter ist also die Hemmung der Lichtemission der Bakteriensuspension, genauer gesagt, die Leuchtintensitätsabnahme gegenüber einem Kontrollansatz.

In Anwesenheit von toxischen Stoffen kommt es während einer Kontaktzeit von 30 Minuten zu einer Abnahme der Lichtintensität. Die Ergebnisse werden durch EC20-, EC50- oder EC80-Werte angegeben. Dabei entspricht der EC-Wert einer Hemmkonzentration, bei der eine Hemmung von 20, 50 oder 80 % vorliegt. Weiterhin wird der GI<sub>50</sub>-Wert verwendet. Dieser gibt die niedrigste getestete Verdünnungsstufe an, bei der die Hemmung der Biolumineszenz nach 30 min kleiner 20 % war.

Der Test erfolgte mit einem LUMIStox-Photometer und einer LUMIStherm-Inkubationseinheit der Firma Dr. Lange. Dafür wurde ca. 5 mL Probe abgefüllt und bis zur Messung im Tiefkühlfach (-20 °C) aufbewahrt. Vor der Messung erfolgte eine Kontrolle des pH-Wertes, welcher zwischen 6 und 8,5 liegen sollte. Die Proben wurden zunächst aufgesalzen (mit 2 g/L NaCl) und eine Verdünnungsreihe erstellt. Durch die anschließende Verdünnung mit der Bakteriensuspension kam die untersuchte Probe maximal in einer Verdünnung von 1:2 zum Einsatz. Die verwendeten Leuchtbakterien wurden bei -70 °C aufbewahrt und vor der Messung mit speziellem Medium eine Stunde lang bei 15 °C reaktiviert. Als Vergleichswerte dienten Zinksulfat, 3,5-Dichlorphenol und Kaliumdichromat (Standards) sowie NaCl (Blindwert).

Der Leuchtbakterienhemmtest ist ein Standardverfahren zum Nachweis akut toxischer Substanzen. Der Test zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und kurze Inkubationszeiten aus (Tiehm et al., TZW-Band).

### 3.3. Chemisch-analytische Verfahren

#### 3.3.1. Hochdruckflüssigchromatographie-Diodenarray Detektor (HPLC-DAD)

Der Abbau von Bisphenol A (BPA) und 2-Hydroxybiphenyl (2-HBP) bei erhöhten Konzentrationen sowie Messungen zur Wiederfindung der Substanzen nach Anreicherung mittels SPE, wurden mittels HPLC-DAD gemessen. Dazu wurde eine HPLC 1200 Series der Firma Agilent Technologies mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) verwendet.

Es wurden Proben von je 10 mL über einen Polyethersulfonat-Filter (Acrodisc Syringe Filters, PALL GmbH) der Porenweite 0,45 µm filtriert. Bei Versuchsansätzen mit Bisphenol A wurde vor der Filtration der pH-Wert mit 5 M Natronlauge eingestellt, sodass er über dem pKa-Wert von 10,3 lag. Dadurch wurde eine Sorption der Substanzen am Filter verhindert. Filtriert wurde in ein 10 mL Schraubdeckelgläschen, das bei -20 °C eingefroren wurde.

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese zur Messung 1:2 mit Ethanol in einem Braunglas-Vial (2 mL) verdünnt und verschlossen. Die Messung erfolgte anhand einer Gradientenelution, die in Tab. 3 dargestellt ist. Zur Trennung der einzelnen Substanzen wurde eine Luna<sup>®</sup> C18 Säule (250 mm \* 2 mm) der Firma Phenomenex verwendet. Diese wurde später durch eine Gemini<sup>®</sup> C18 Säule (250 mm \* 2 mm) der Firma Phenomenex ausgetauscht – die Methode wurde entsprechend angepasst. Verwendet wurde ein DAD-Detektor mit den Wellenlängen 210 nm, 228 nm, 246 nm und 280 nm. Die Zuordnung und Bestimmung der Substanzkonzentrationen erfolgte über eine Kalibrierung mit entsprechenden Standards. Die Standards wurden aus einer Stammlösung hergestellt, welche durch die Zugabe von MilliQ-Wasser mit 0,05 % Ameisensäure und Ethanol verdünnt wurden. Tab. 4 enthält eine Auflistung der kalibrierten Substanzen sowie ihrer Retentionszeiten (RT) und Bestimmungsgrenzen (BG).

Tab. 3: Zeitlicher Verlauf der Gradientenelution der HPLC-DAD

Zeit [min]	Eluent A Acetonitril + 0,05% Ameisensäure	Eluent B MilliQ + 0,05% Ameisensäure	Durchflussrate in ml/min	Druck in bar
0	50%	50%	0,3	380
7	57%	43%	0,3	380
9	100%	0%	0,3	380
15	100%	0%	0,3	380
20	50%	50%	0,3	380



**Tab. 4: Untere und obere BG sowie RT der Substanzen bei der Messung mittels HPLC-DAD**

Substanz	RT in min	Untere BG in mg/L	Obere BG in mg/L
Bisphenol A	4,95	0,11	28,25
17 $\beta$ -Estradiol	5,53	0,09	21,25
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	6,44	0,09	21,75
2-Hydroxybiphenyl	7,77	0,14	34,25
Mestranol	13,79	0,09	21,50
4-tert-Octylphenol	14,32	0,08	20,75
4-n-Nonylphenol	15,86	0,10	24,00

### 3.3.2. Gaschromatographie-Massenspektrometer (GC-MS)

Die chemische Analyse im Spurenstoffbereich erfolgte durch die Abteilung Analytik des Technologiezentrums Wasser Karlsruhe. Diese erreicht die notwendige Bestimmungsgrenze von 1 ng/L für die Steroidhormone. Vor der Analyse wurde der pH-Wert von 1000 mL Probe mit Salzsäure oder Natronlauge auf etwa 6,5 eingestellt und 10  $\mu$ L einer internen Standardmischung zugegeben. Die Extraktion der Analyten erfolgte über eine automatisierte AutoTrace Arbeitsstation von Zymark und Strata X-Kartuschen (100 mg) von Phenomenex. Nach der Anreicherung wurde das Festphasenmaterial in einem sanften Stickstoffstrom getrocknet und mit 2 x 2 mL Aceton eluiert. Dann wurde das Eluat bis zu einem Volumen von etwa 100  $\mu$ L eingengt. Im Anschluss erfolgte unter leichtem Vakuum die vollständige Trocknung in einem Ofen bei 80 °C. Der Rückstand wurde in 100  $\mu$ L N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid mit 0,4 % Iodtrimethylsilan, welches u.a. als Derivatisierungsvermittler dient, aufgenommen. Die Silylierung dauerte 35 Minuten und fand ebenfalls bei 80 °C in einem Ofen statt. Zuletzt wurde eine Teilmenge der Reaktionslösung in das GC-MS-System (6890 Series plus Gaschromatograph mit einem MSD 5973 massenselektiven Detektor von Agilent Technologies) injiziert.

Mittels GC-MS wurden E1, E2, Estriol (E3), 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2), Mestranol (MeEE2) sowie Norethisteron quantifiziert. Des Weiteren wurden die Alkylphenole 4-tert.-Oktylphenol, 4-iso-Nonylphenol, sowie BPA mit der gleichen Methode erfasst. Die BG ist abhängig vom verwendeten Anreicherungsfaktor.

### 3.3.3. Gelöster Organischer Kohlenstoff (DOC)

Die Betrachtung des DOC im Vergleich mit den Ergebnissen chemischen Analytik lässt einen Rückschluss auf die Mineralisierung der Substanz, sowie die Entstehung möglicher Reaktionsprodukte zu.

Für die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) in den Proben wurde das Messgerät vario TOC cube der Firma Elementar verwendet. 10 mL der Proben wurden mit einem vorgespülten Polyethersulfonat-Filter (Acrodisc Syringe Filter, Porenweite 0,45 µm) der Firma Pall in ein 10 mL Schraubdeckelgläschen filtriert. Daraufhin wurde die Probe mit 1 bis 2 Tropfen einer 1:2 verdünnten Salzsäure versetzt, die zum einen den weiteren mikrobiologischen Abbau hemmt und zum anderen die Strippung des gelösten CO<sub>2</sub> ermöglicht. Rückstellproben wurden bei 4 °C gelagert. Der vario TOC cube verbrennt den gesamten organisch gebundenen Kohlenstoff der Probe bei 1200 °C zu CO<sub>2</sub>. Eine Quantifizierung der CO<sub>2</sub>-Konzentration erfolgte per Doppelbestimmung mit einem nicht-dispersiven Infrarotsensor (NDIR-Sensor). Der Messbereich lag in einem Konzentrationsbereich von 0,2-30 mg/L, bei höheren Konzentrationen erfolgte eine entsprechende Verdünnung.

### 3.3.4. Ionenchromatographie

Die Ionenchromatographie beruht auf Verteilung der zu trennenden Ionen zwischen einer festen, stationären Phase und einer flüssigen, mobilen Phase. Zur Messung wurden 10 mL Probe durch einen vorgespülten Rotrandfilter der Porengröße 0,2 µm (Schleicher und Schuell) in ein 10 mL Schraubdeckelgläschen filtriert. Rückstellproben wurden bis zur Messung bei -20 °C tiefgefroren. Die Messung erfolgte durch den Ionenaustauschchromatographen 761 Compact IC mit der Trennsäule Metrosep A Supp 5 (150 \* 4 mm) der Firma Metrohm. Eine mit 2 % Aceton versetzte 3,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> und 1,0 mM NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Pufferlösung diente als Eluent, eine 0,1 %ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung als Regenerent. Die kalibrierten Ionen und deren BG sind in Tab. 5 aufgeführt.

**Tab. 5: Kalibrierte Ionen und BG bei der Ionenchromatographie**

Parameter	Untere BG in mg/L	Obere BG in mg/L
Chlorid	0,5	50
Nitrit	0,5	50
Nitrat	1	100
Sulfat	1	100
Phosphat	1	100

### 3.3.5. Eisen(III)-Bestimmung

Eisen(III) wurde zu den jeweiligen anaeroben Batchansätzen als spezifischer terminaler Elektronenakzeptor zugesetzt. Eine direkte Bestimmung von Eisen(III) ist jedoch nicht möglich, weshalb die Eisen(III)-Konzentrationen aus der Differenz Gesamteisen und Eisen(II) errechnet wurde. Die Eisen-Messung basiert auf einer photometrischen Bestimmung mit dem NANOCOLOR® Testkit für Eisen bei 470 nm. Die Bestimmung der Eisen(II)-Ionen beruht auf der Bildung eines orangeroten Komplexes  $[C_{36}H_{24}FeN_6]^{2+}$  mittels 1,10-Phenanthrolin, während die Bestimmung des Gesamteisens auf der Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II)-Ionen mittels Hydroxylammoniumchlorid und einer anschließenden Bestimmung von Eisen (II) durch den erwähnten orangeroten Komplex basiert. Dabei verhindert eine Ansäuerung der Proben (10 mL) mit 200 µL halbkonzentrierter Salzsäure eine Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) unter Luftsauerstoff. Die Messung der Proben fand jeweils zeitnah statt.

### 3.4. Verwendete Modellsubstanzen

Im Rahmen dieses Projektes wurden zur Validierung des YES-Tests und für Abbauersuche estrogenere Modell-Substanzen ausgewählt. Zu diesen Substanzen zählen u.a. die natürlichen Steroidhormone E1, E2 und E3 sowie die synthetischen Steroide EE2 und MeEE2, die beide für den Einsatz in der Anti-Baby-Pille entwickelt wurden. Als Vertreter der Industriechemikalien wurden BPA, 2-HBP, Benzylbutylphthalat (BBP), 4-tert.-Octylphenol (OP) und 4-n-Nonylphenol (4-n-NP) ausgewählt. Bei diesen handelt es sich um Ausgangsstoffe für Kunststoffe, Weichmacher bzw. ein nichtionisches Tensid. Zusätzlich wurde als Pestizid Endosulfan (ES) untersucht. Der Abb. 4 können die Strukturformeln entnommen werden. E3, EE2 sowie MeEE2 besitzen alle ein E2 Grundgerüst. E3 hat eine zusätzliche Hydroxygruppe und EE2 eine zusätzliche Ethinylgruppe.

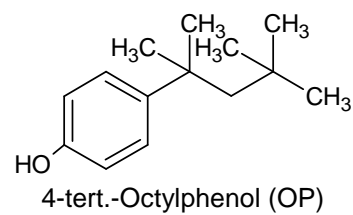
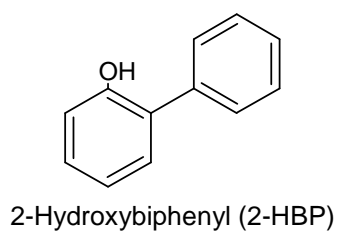
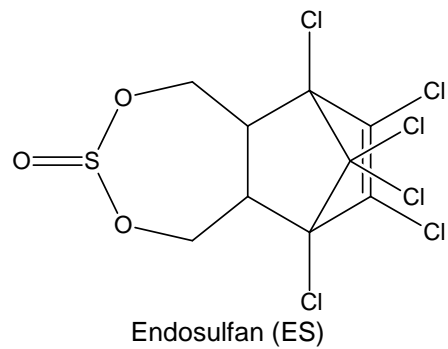
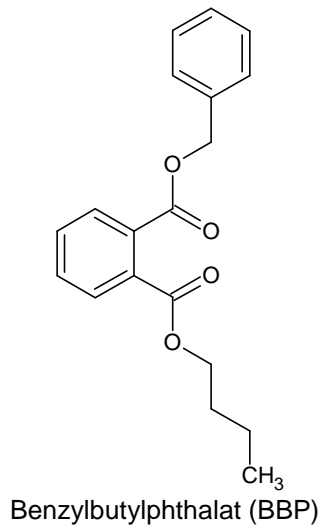
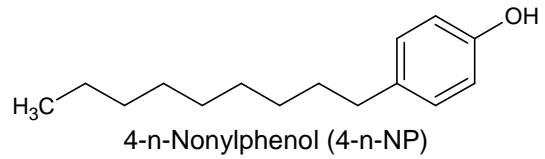
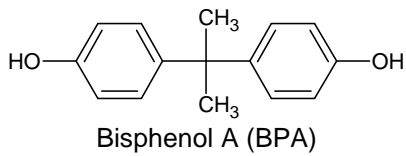
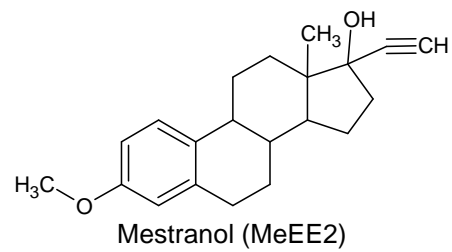
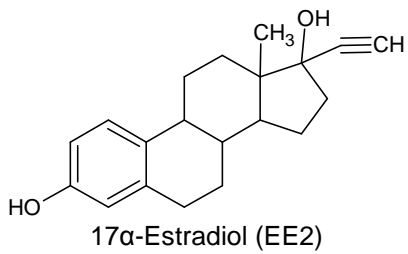
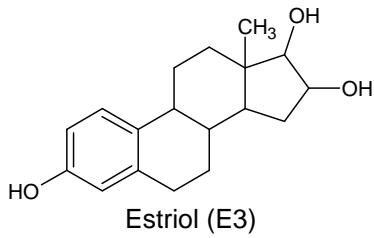
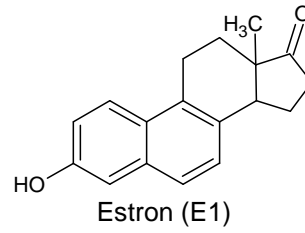
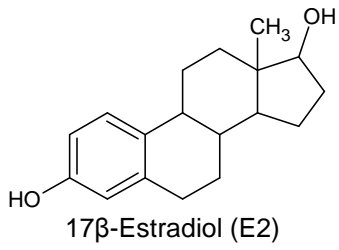


Abb. 4: Strukturformeln der ausgewählten Modellsubstanzen

Wasserlöslichkeit, Henry-Konstante sowie Molekulargewicht der Substanzen können Tab. 6 entnommen werden.

**Tab. 6: Physikalische Eigenschaften der ausgewählten Modellsubstanzen (ChemIDplus lite oder \*SRC 2011)**

Substanz	CAS- Nummer	Wasserlöslich- keit in mg/L	Log $K_{ow}$	Henry Konstante in atm*m <sup>3</sup> /mol	Molekular- gewicht in g/mol
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol (E2)</b>	50-28-2	3,6 (27°C)	4,01	3,64E-11 (25°C)	272,4
<b>Estriol (E3)</b>	50-27-1	441 (25°C)	2,45	1,33E-12 (25°C)	288,4
<b>Estron (E1)</b>	53-16-17	33 (25°C)	3,13	3,8E-10 (25°C)	270,4
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol (EE2)</b>	57-63-6	11,3 (27°C)	3,67	7,94E-12 (25°C)	272,3
<b>Mestranol (MeEE2)</b>	72-33-3	0,977 (25°C)*	4,68	4,51E-09 (25°C)*	310,4
<b>Bisphenol A (BPA)</b>	80-05-7	120 (25°C)	3,32	1,00E-11 (25°C)	228,3
<b>4-n-Nonylphenol (4-n-NP)</b>	104-40-5	7 (25°C)	5,75	3,40E-05 (25°C)	220,3
<b>Benzylbutylphthalat (BBP)</b>	85-68-7	2,69 (25°C)	4,73	1,26E-06 (25°C)	312,4
<b>Endosulfan (ES)</b>	115-29-7	0,325 (22°C)	3,83	6,50E-05 (20°C)	406,9
<b>2-Hydroxybiphenyl (2-HBP)</b>	90-43-7	700 (25°C)	3,09	1,05E-06 (25°C)	170,2
<b>4-tert.-Ocytlphenol (OP)</b>	140-66-9	5 (25°C)	5,28	6,89E-06 (25°C)	206,32

### 3.5. Abbauprobungen

Im Verlauf dieses Projektes wurden Abbauprobungen unter verschiedenen Redoxbedingungen durchgeführt. Ausgewählt wurden hierfür die Xenohormone BPA und 2-HBP, sowie die natürlichen Hormone E1, E2 und E3 und die synthetischen Hormone EE2 und MeEE2.

#### **Stammlösungen**

Zum Aufdotieren der Abbauprobungen wurde jeweils eine Stammlösung der Substanzen auf Methanolbasis hergestellt. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Stammlösung in jeweils eine 1 L-Batchflasche gegeben. Die Substanzen wurden nach dem Abdampfen des Methanols in der jeweiligen Wasserprobe gelöst.

#### **Grundlage der Abbauprobungen**

Für den Abbau der Xenohormone BPA und 2-HBP wurde ein Mineralmedium verwendet. Anschließend wurde 2 % frischer Belebtschlamm der Kläranlage Karlsruhe-Neureut zuge-

geben. Dieser wurde zuvor mit dem Medium mehrmals gewaschen, um Verunreinigungen auszuschließen.

Das Medium wurde wie folgt angesetzt:

5,24 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,5 g  $\text{KNO}_3$

0,2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,1 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

5 ml fertige Spurenelementlösung mit EDTA

auffüllen auf 5 L

pH einstellen auf  $7,1 \pm 0,2$

20 min bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  autoklavieren

Für den Abbau der Steroidhormone wurden zur Animpfung Proben aus einer Uferfiltration bei Dortmund verwendet. Die Proben aus der Uferfiltration selbst wiesen keine estrogenere Wirkung im L-YES-Assay auf.

### ***Redoxbedingungen***

Es wurden Abbauprobversuche unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt. Für die anaeroben Abbauprobversuche wurde das Medium entgast und in der Anaerobox (siehe Abb. 5, links) in die Mikrokosmengefäße gefüllt. Das Uferfiltrat wurde bereits nach Probeneingang bis zum Ansetzen der Abbauprobversuche unter Ausschluss von Sauerstoff in Anaerob-übertöpfen gelagert (siehe Abb. 5, rechts). Sowohl das Ansetzen als auch die Beprobung der anaeroben Abbauprobversuche fand in der Anaerobox statt. Diese Ansätze wurden zwischen den Beprobungen unter Ausschluss von Sauerstoff in Anaerob-übertöpfen gelagert.



**Abb. 5: Anaerobbox und Inkubation der Ansätze in Anaerobgefäßen**

Zu den Ansätzen der Steroidhormone wurden verschiedene Elektronenakzeptoren zudosiert:

- Sulfat, d.h. Zudosierung von Sulfat in Form von Natriumsulfat (20 mg/L)
- Nitrat, d.h. Zudosierung von Nitrat in Form von Natriumnitrat (10 mg/L)
- Eisen, d.h. Zudosierung von Eisen(III) in Form FeOOH von (50 mg/L)

### ***Monitoring des mikrobiellen Abbaus***

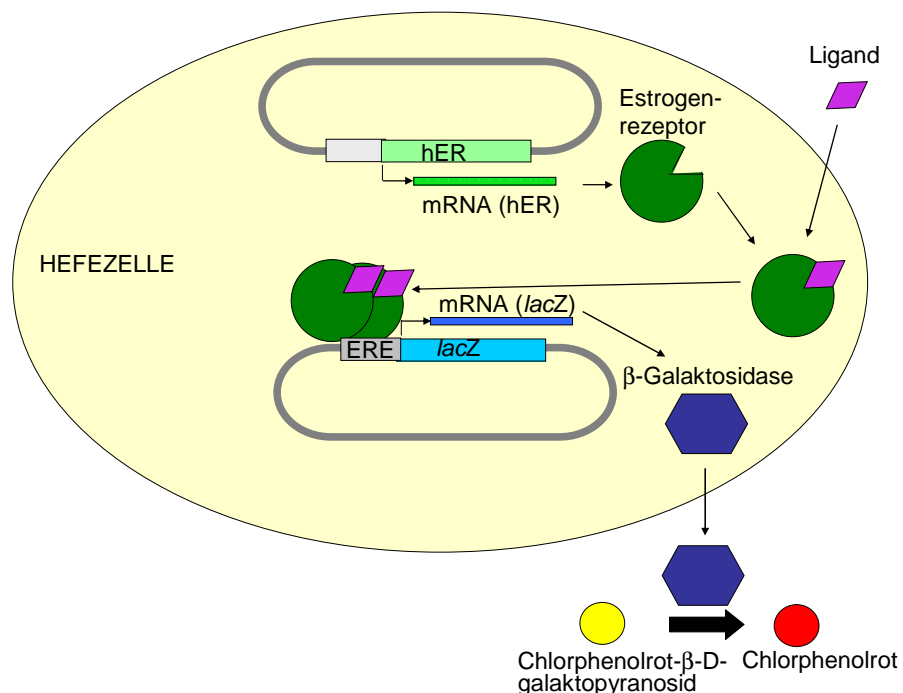
Die Bestimmung der Substanzen fand mittels HPLC-DAD (BPA, 2-HBP) bzw. mittels GC-MS (Hormone) statt. Zusätzlich wurden die estrogene Aktivität mittels L-YES-Assay, der pH, die Sauerstoffkonzentration (anaerobe Ansätze), der DOC und z.T. Ionengehalte, sowie Eisen-Gehalte bestimmt.

## **4. Etablierung des YES-Assays**

### **4.1. Prinzip**

Der YES-Assay beruht auf der Verwendung gentechnisch modifizierter Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), um Substanzen zu ermitteln, die estrogene Wirksamkeit besitzen. Dazu wurde das Gen des menschlichen Estrogenrezeptors (human estrogen receptor, hER) stabil in das Hauptchromosom der Hefe integriert (Routledge and Sumpter, 1996). Um die Rezeptoraktivität zu messen, wurde zusätzlich ein Expressionsplasmid eingefügt, welches das Reportergen lacZ, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, trägt. Das Gen hER wird konstitutiv abgelesen und der Estrogenrezeptor wird gebildet. Nach

Bindung hormonaktiver Substanzen an den Rezeptor kommt es zur Bildung eines Substrat-Rezeptor-Komplexes. Dieser aktivierte Rezeptor bindet an die estrogenabhängige Sequenz auf dem modifizierten Plasmid (ERE, estrogen responsive elements). Die ERE liegen innerhalb einer starken Promotorsequenz auf dem Expressionplasmid, sodass die Bindung des Komplexes an die ERE zur Expression des nachgeschalteten lacZ-Gens führt und damit auch zur Biosynthese des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Die Aktivität des Enzyms lässt sich letztendlich durch Zugabe eines geeigneten Substrates (z.B. Chlorphenolrot- $\beta$ -Galaktopyranosid) photometrisch bestimmen. Mit der chromogenen Substanz Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CPRG) kann nun quantitativ die Menge an gebildeter  $\beta$ -Galaktosidase ermittelt werden. Diese spaltet CPRG und setzt Chlorphenolrot frei. Der sich ergebende Farbumschlag von gelb nach rot kann photometrisch bestimmt werden (Routledge und Sumpter, 1996). Eine schematische Darstellung der Wirkkaskade kann Abb. 6 entnommen werden.



**Abb. 6:** Schema zur Detektion von estrogen wirksamen Substanzen mittels YES-Assay

Die einfache Handhabung und die kurze Generationszeit der Hefezellen in Kultur sowie ihre eukaryontischen Eigenschaften machen den YES-Assay zu einem geeigneten *in vitro* Nachweissystem zur Erfassung estrogenaktiver Substanzen.



## 4.2. Übertragbarkeit

Während mittels *in vivo* Assays komplexe Vorgänge wie Absorption, Metabolismus, Verteilung und Ausscheidung der Substanzen berücksichtigt werden, ist die Wechselwirkung in *in vitro* Assays deutlich beschränkt, da lediglich die Bindung an Rezeptoren ermittelt wird. Dazu werden entweder die aufgereinigten Rezeptoren oder Zellkulturverfahren genutzt.

Als Beispiele für *in vivo* Assays kann der „rodent uterotrophic Assay“ sowie die Vitellogenin-Induktion genannt werden. Für den „rodent uterotrophic Assay“ wird Mäusen über einen definierten Zeitraum die zu untersuchende Substanz verabreicht und im Anschluss operativ die Gebärmutter entfernt und untersucht. Für die Vitellogenin-Induktion wird das Wasser von Fischen kontaminiert und die Plasmavitellogeninkonzentration der männlichen Fische bestimmt. Beide Verfahren sind zeitaufwändig, teuer und erfordern viele Tiere. Daher ist der Bedarf an ethisch unbedenklichen, günstigen und schnell durchzuführenden Alternativen groß.

Als *in vitro* Assays werden neben dem YES-Assay z.B. der „estrogen receptor competitive binding assay“ oder der E-Screen genutzt. Für den E-Screen wird die Zellproliferation einer menschlichen Brustkrebszelllinie als Endpunkt bestimmt (Beresford et al., 2000).

In einigen Veröffentlichungen wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der chemischen Analytik sowie von verschiedenen Bioassays überprüft. Leusch et al. (2010) attestieren allen untersuchten Assays ähnliche Trends und gute Übereinstimmung mit der chemischen Analytik. Für den YES-Assay wird dabei eine um eine Größenordnung geringere Sensitivität festgestellt. Mittels Lytikase-Aufschluss der Hefezellen (L-YES) kann die Sensitivität jedoch um etwa eine Größenordnung erhöht werden (Schultis et al., 2004). Fang et al. (2000) stellen eine sehr gute Übereinstimmung ( $r^2 = 0,78$ ) des YES-Assays mit einem simple ligand binding Assay für estrogene Agonisten fest. Der Vergleich mit dem E-Screen zeigt eine etwas schlechtere lineare Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,72. Dennoch überwiegen die Vorteile des YES-Assay, denn er ist ein sensitiver und einfach durchzuführender Bioassay. Dahingegen ergibt sich bei der Inkulturnahme von menschlichen Brustkrebszellen bei der Durchführung des E-Screens ein deutlich höherer labortechnischer Aufwand.

### 4.3. Geräte und Verbrauchsmaterial

#### Produkt; Firma

- -20 °C Kühltruhe; Liebherr
- -70 °C Kühltruhe; Sanyo
- Autoklav C-frei; Integra Bioscience
- Autoklav C-haltig; Webeco
- Autoklav unrein; Memmert
- Bechergläser; Schott
- Breath Easy Versiegelungsmembranen; Sigma-Aldrich
- Brutschrank 30 °C; Heraeus
- Einmal-Küvetten, PS, 1,5 mL; Brand
- Gaschromatographie Vials; Agilent
- Incubating Microplate Shaker; VWR
- Incubating Mini Shaker; VWR
- Kühlschrank; Liebherr
- Kunststoffverbrauchswaren; VWR
- Mechanische Einkanalpipetten; VWR
- Mehrkanalpipette 25-1250 µL; Vialab Technologies
- Membranfilter Supor®-450, 47 mm, 0,45 µm; Pall
- Messkolben; Schott
- Messpipetten; Hirschmann
- Messzylinder; Fortuna
- Mikrotiterplatten, steril, R; Nunc

#### Produkt; Firma

- Multiskan FC Version 10079 mit Skanlt 3.0.0.64 RE for Multiskan FC; Thermo Scientific
- Nanophotometer; Implen
- Pasteurpipetten; Brand
- Petri Schalen 94x16, H, steril; Greiner Bio One
- pH-Meter; WTW
- Research pro Mehrkanalpipetten; Eppendorf
- Sartolab RF150, PES, 0,22 µm, steril; Sartorius Stedim
- Schraubdeckelflaschen; Schott
- Schraubverschluss-Probenflaschen; Agilent
- Sicherheitswerkbank GL-130 Class II; Kojair
- SigmaPlot 2002 for Windows Vers. 8.0; Systat Software
- Simplicity 185; Millipore
- Steilbrustflaschen; Duran Group
- Vakuum Gas Pumpe; VWR
- Verschlussfolie; Parafilm
- Waagen (Fein/Mittel/Grob); Sartorius
- Zentrifuge Mikro 120; Hettich

### 4.4. Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen wurden mit Reinstwasser (MilliQ) angesetzt. Das Reinstwasser wurde mittels Simplicity 185 der Firma Millipore auf einen Widerstand von 18,2 MΩ/cm aufgereinigt. Als Negativkontrollwasser wurde steriles Reinstwasser genutzt. Alle übrigen Chemikalien, soweit nicht gesondert angegeben, wurden von AppliChem bezogen.

Das Wachstumsmedium wurde aus zwei 10-fach konzentrierten Stammlösungen angesetzt. Die 10x SD-Stammlösung bestand aus 67 g/L Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Amino-

säuren, Otto Nordwald) sowie 200 g/L wasserfreie D(+)-Glukose. Die 10x DO-Stammlösung bestand aus 0,2 g/L Adenin (Sigma-Aldrich), 0,2 g/L L-Arginin, 1,0 g/L L-Asparaginsäure, 1,0 g/L L-Glutaminsäure, 0,2 g/L L-Histidin, 0,3 g/L L-Isoleucin, 1,0 g/L L-Leucin, 0,336 g/L L-Lysin-Monohydrat, 0,2 g/L L-Methionin, 0,5 g/L L-Phenylalanin, 4,0 g/L L-Serin, 2,0 g/L L-Threonin, 0,3 g/L L-Tyrosin und 1,5 g/L L-Valin. Beide Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Die 10x SD-Stammlösung ist 8 Wochen und die 10x DO-Stammlösung 4 Wochen haltbar.

Der *lacZ*-Puffer bestand aus 8,52 g/L Dinatriumhydrogenphosphat, 0,75 g/L Kaliumchlorid und 0,25 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat. Nach der Titration auf pH 7,0 mit 40 %iger Schwefelsäure (96 %, Roth) wurde der Puffer autoklaviert. Zuletzt wurde 1 g/L Natriumdodecylsulfat zugegeben. Für die Kupfersulfatlösung wurden 2,497 g/L Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat gelöst und die Lösung anschließend autoklaviert. Beide Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert und sind zwölf Monate haltbar.

#### 4.5. Kulturen

Die angepasste Standardarbeitsanweisung wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Henner Hollert (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Institut für Umweltforschung) zur Verfügung gestellt. Diese Standardarbeitsanweisung wurde abgeändert und an die Laborausstattung des TZW angepasst.

Zur Langzeitlagerung wurden Cryokulturen angesetzt. Hergestellt wurden diese Cryokulturen aus einer Flüssigkultur, die 1:2 mit 80 %igem Glycerol ( $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich) verdünnt und bei -70 °C eingefroren wurde. Mittels Quadrantenausstrich wurden je 125  $\mu$ L der Cryokultur auf zwei Agarplatten vereinzelt. Dazu wurde doppelt konzentriertes Wachstumsmedium mit 25 g/L Agar-Agar (bakteriologisch, Roth) versetzt und in Petri-Schalen gegossen. Die angeimpften Petrischalen wurden etwa zwei Tage lang bei 30 °C bis zu einer Koloniegröße von etwa 1 mm inkubiert. Im Anschluss wurden die Petri-Schalen mit Parafilm verschlossen und für maximal drei Wochen bei 4 °C gelagert. Zum Animpfen einer frischen Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte gepickt und in Einfachmedium überführt. Die angeimpfte Flüssigkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 750 rpm inkubiert. Mittels OD-Messung bei 595 nm wurde am Folgetag die Zelldichte bestimmt und auf eine  $OD_{595nm}$  von etwa 1,1 verdünnt. Die Flüssigkultur wurde vor der Nutzung bereits einen Tag bei 4 °C gelagert und wöchentlich frisch angesetzt.

## 4.6. Durchführung des L-YES-Assay

### Ansatz

#### Herstellung des E2-Standards

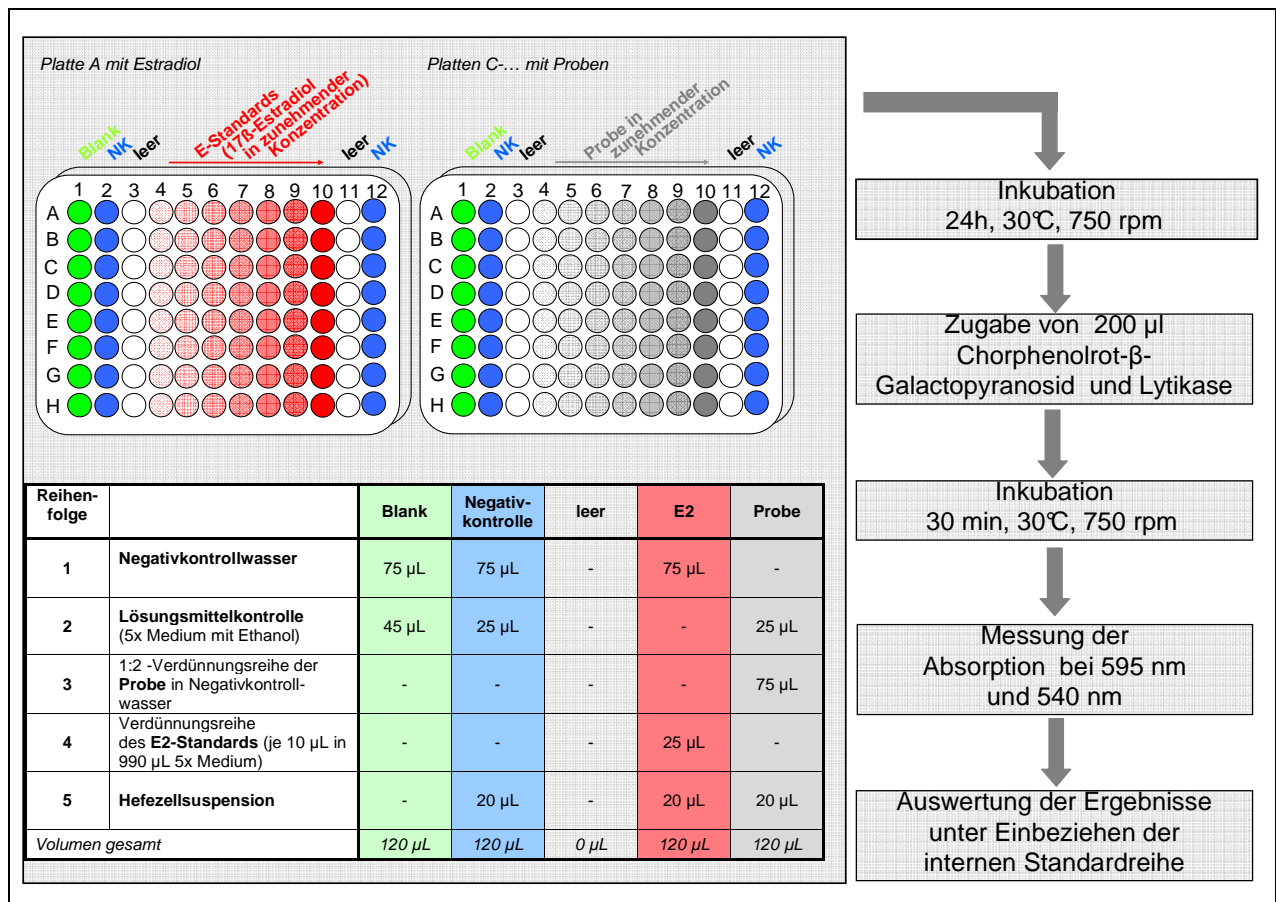
Die Substanz E2 wurde als Standard bei jeder Messung mitgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung und verschiedene Verdünnungen in Ethanol in einem Konzentrationsbereich von  $1E-5$  bis  $1E-12$  mol/L in kleinen Braunglas-Vials mit Gewindedeckel angesetzt. Die Lösungen wurden bei  $4^{\circ}C$  gelagert und zusätzlich mit Parafilm verschlossen. Die Standards sind bis zu 6 Wochen haltbar.

#### Probenvorbereitung

Vor dem Ansatz des L-YES-Assays wurde für jede Probe der pH-Wert gemessen und bei Bedarf auf einen pH-Wert zwischen sechs und sieben eingestellt. Hierzu wurde 1 M NaOH, genutzt.

#### Tag 1: Ansatz der Mikrotiterplatten

Für den L-YES-Assay wird zunächst 5x Medium angesetzt. Dazu wurden 10x SD und 10x DO zu gleichen Volumenanteilen gemischt und 0,66 g/L Ampicillin Natriumsalz (Sigma-Aldrich) sowie 0,66 g/L Streptomycin Sulfatsalz (Sigma-Aldrich) zugegeben. Des Weiteren wurden 10 mmol/L an Kupfersulfatlösung beigemischt. Die Aufteilung der Mikrotiterplatten, das Pipettierschema und ein grober Überblick zur Versuchsdurchführung können Abb. 7 entnommen werden.



**Abb. 7: Aufteilung der Mikrotiterplatten, Pipettierschema und ein grober Überblick zur Versuchsdurchführung des YES**

Zu Beginn wurden 75 µL Negativkontrollwasser in alle Blank-, Negativkontroll (NK)- und E2-Wells vorgelegt. Im Anschluss folgte die Herstellung der Lösungsmittelkontrolle. Bei dieser handelte es sich um 5x Medium mit einem Volumenprozent Ethanol (absolut für Analyse, Merck). Je Blankwell wurden 45 µL, je Negativkontrollwell 25 µL und je Probenwell 25 µL Lösungsmittelkontrolle zugegeben.

Die Proben wurden danach in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit MilliQ-Wasser verdünnt. Je Well wurden 75 µL in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Stammlösungen des E2-Standards sowie der Modellsubstanzen auf Ethanolbasis wurden 1:100 in 5x Medium verdünnt und je 25 µL in die entsprechenden Wells pipettiert.

Zum Abschluss wurde die Flüssigkultur aus dem Kühlschrank entnommen und bei 14.000 rpm sieben Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz in 5x Medium resuspendiert. Je Well wurden 20 µL Hefezellsuspension zugegeben und die Platten mit Breath Easy-Versiegelungsmembranen verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C mit 750 rpm für 24 Stunden.

### Tag 2: Messung der optischen Dichte

Am Folgetag wurde für jedes Well der Platten die Zelldichte optisch bei 595 nm gemessen und automatisch ein Messprotokoll samt Messdaten erstellt. Dazu wurde der Boden jeder Platte mit technischem Ethanol (Roth) abgewischt. Unmittelbar vor der Messung wurde jede Platte im Photometer für fünf Sekunden kräftig geschüttelt.

Im Anschluss wurde in jedes Well 100 µL *lacZ*-Lösung pipettiert. Dabei wurde ein Dreißig-Sekunden-Takt je Platte eingehalten. Die *lacZ*-Lösung wurde kurz vor der Messung aus *lacZ*-Puffer, 0,4 g/L CPRG ( $\geq 90$  %, Sigma-Aldrich), 0,095 g/L Lytikase (von *Arthrobacter luteus*,  $\geq 200$  Units/mg, Sigma-Aldrich) sowie 2,5 mL/L  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich) hergestellt.

Unmittelbar nach der Zugabe der *lacZ*-Lösung wurde alle zehn Minuten, ebenfalls im Dreißig-Sekunden-Takt, die OD bei 540 nm gemessen und ein Messprotokoll erstellt. Die Messung wurde wiederholt, bis der Mittelwert (MW) der achtfachen Bestimmung der OD<sub>540nm</sub> des E2-Standards bei der höchsten Konzentration zwischen 3,5 und 4,0 lag.

### **Auswertung der Ergebnisse**

Für die Auswertung des YES wird eine Quantifizierung basierend auf dem Prinzip von Äquivalenzkonzentrationen durchgeführt. Mittels der Referenzsubstanz E2 wird eine Dosis-Wirkungskurve generiert (siehe Abb. 8). Die Dosis-Wirkungskurve beschreibt grafisch den Zusammenhang zwischen der verabreichten Dosis und der daraus resultierenden Wirkung. Nach der Rezeptortheorie beruhen die auftretenden Effekte auf der Bindung an körpereigene Rezeptoren nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Erst wenn ausreichend Liganden an die vorhandenen Rezeptoren binden, kommt es zu einem Effekt. Sind alle Rezeptoren abgesättigt, wird ein Plateau erreicht (Fent, 2007). Die Dosis-Wirkungskurven zeichnen sich durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf aus. Der EC50-Wert ist diejenige Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung erreicht wird (Wendepunkt der Kurve).

Als Effekte können unterschiedlichste Endpunkte gewählt werden. Für den L-YES-Assay wird der Farbumschlag von gelb nach rot detektiert, indem die optische Dichte (OD) bei 540 nm gemessen wird.

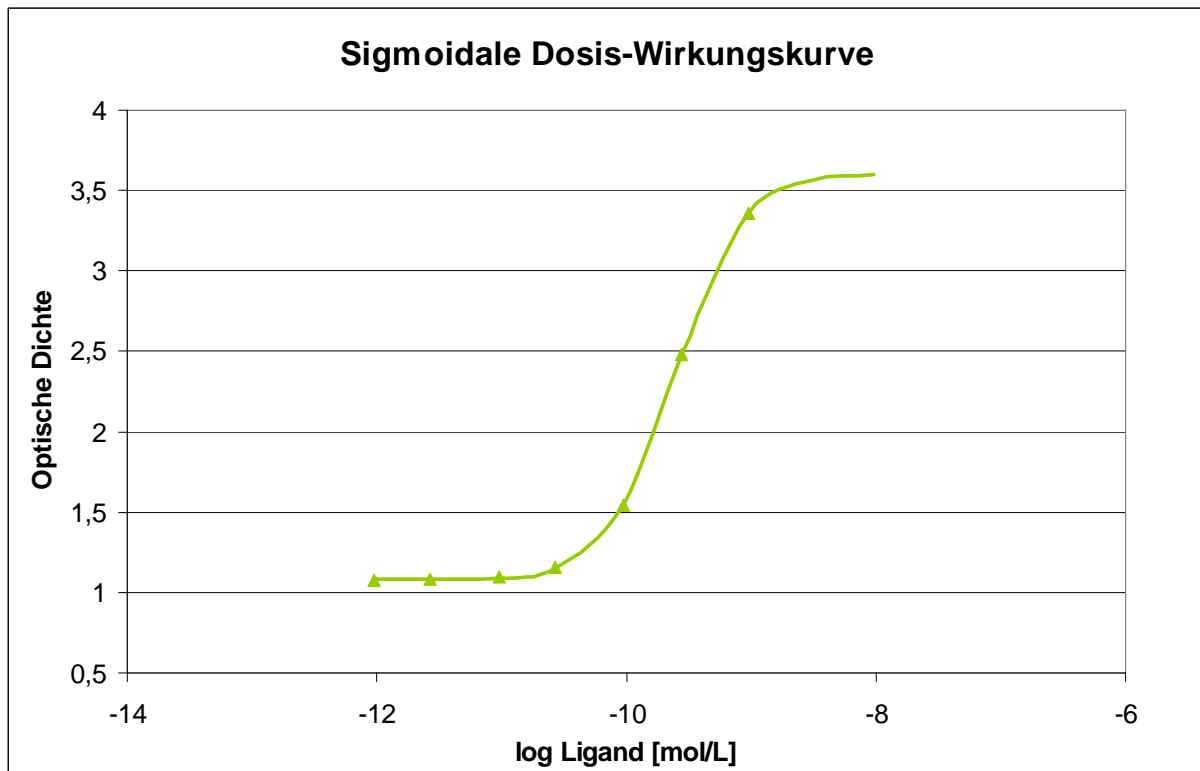
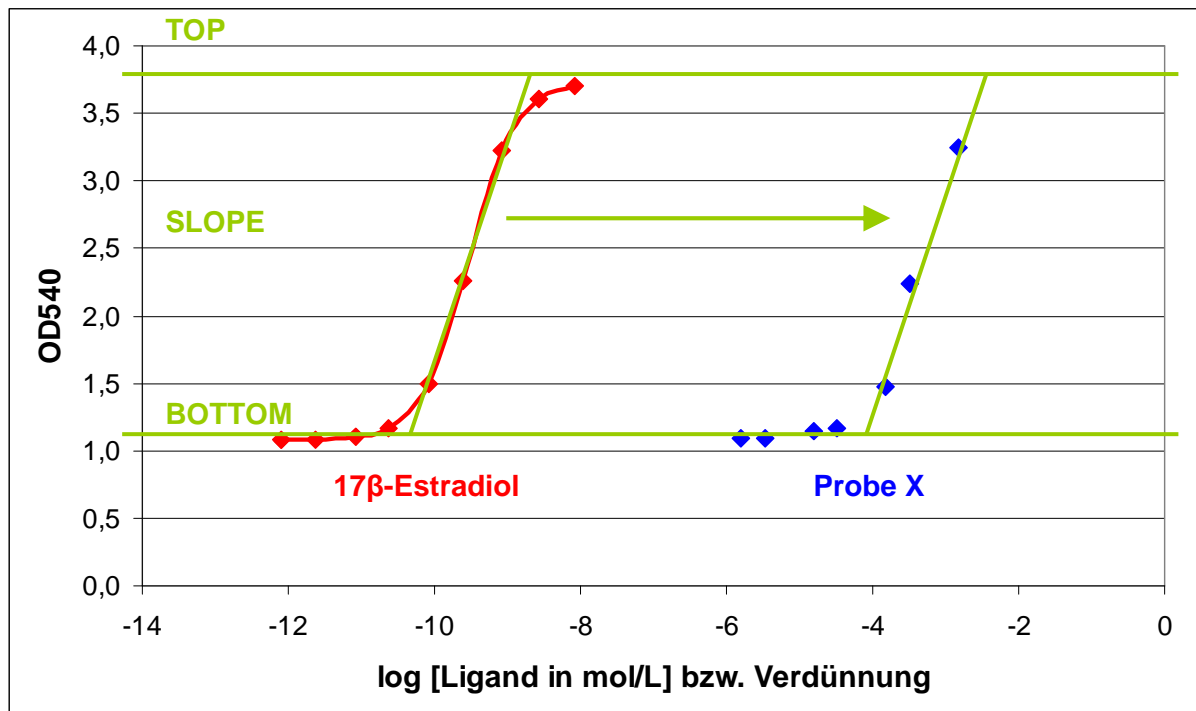


Abb. 8: Darstellung einer Dosis-Wirkungskurve

Der Kurvenverlauf kann in folgender Formel dargestellt werden:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\text{LOGEC50} - X) \cdot \text{Hillslope}}} \quad \text{Formel 1}$$

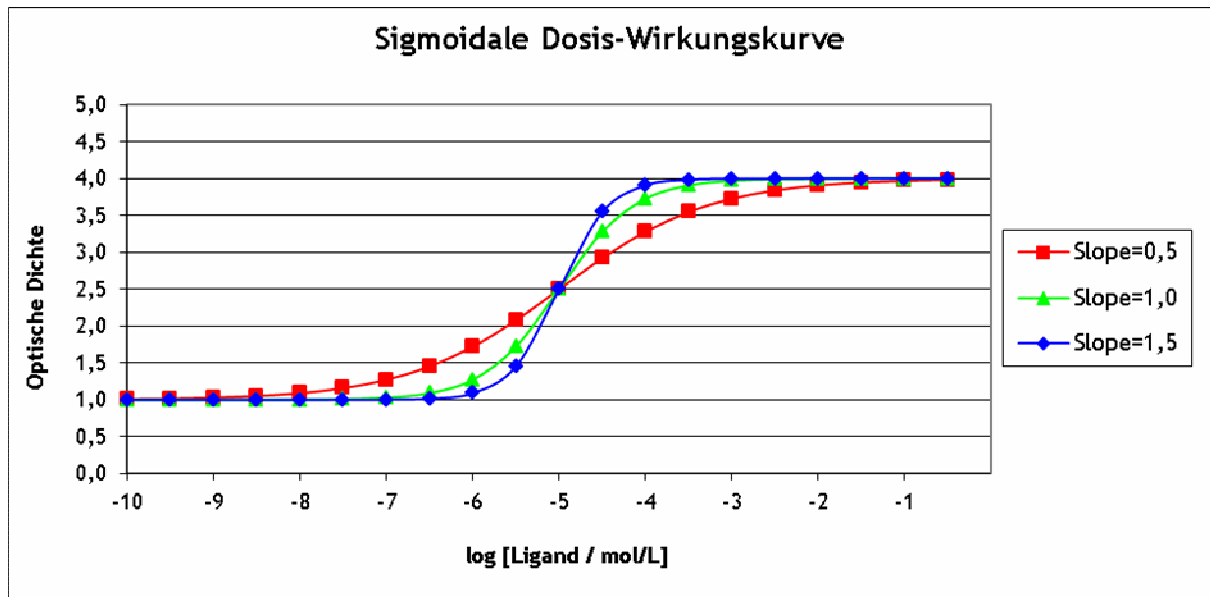
Zur Ermittlung der Kurvenparameter aus Formel 1 wurde das Verfahren der kleinsten Fehlerquadrate verwendet. Dabei stehen Top und Bottom für den oberen sowie den unteren Plateauwert. Bei LOGEC50 handelt es sich um den Logarithmus des EC50. Als vierter Parameter wird der Hillslope, also die Steigung der Kurve, ermittelt. Die Werte Top, Bottom und der Hillslope wurden verwendet um den Messpunkten der Probe eine Dosis-Wirkungskurve anzupassen (siehe Abb. 9) sowie die EEQ der Probe zu berechnen.



**Abb. 9:** Darstellung von Dosis-Wirkungskurven zur Veranschaulichung von Top, Bottom und Hillslope

Durch die Messung vorgegeben sind der Messwert Y sowie die Konzentration bzw. der Verdünnungsfaktor X. Formel 1 kann der Einfluss des Hillslope entnommen werden. Bei kleinem Hillslope treten bereits bei niedrigen Konzentrationen Effekte auf, während das obere Plateau erst bei hohen Konzentrationen erreicht wird. Eine Erhöhung der Konzentration hat nur geringen Einfluss. Ein gegenteiliges Bild zeigt sich bei einem hohen Hillslope (siehe Abb. 10).





**Abb. 10:** Darstellung dreier Dosis-Wirkungskurven mit unterschiedlichem Hillslope

Um die Auswertung der Daten zu beschleunigen, wurde eine Auswertungsmatrix erstellt. Dazu wurden alle nötigen Berechnungen in eine Excel-Datei implementiert und die Übertragung der Photometerdaten vereinfacht. Um Schwankungen der Zelldichte auszugleichen, wurde eine Normierung der Messwerte vorgenommen.

### Äquivalentkonzentration

Das Konzept der toxischen Äquivalentkonzentration liefert rechnerisch mit Hilfe von Literatur- bzw. Labordaten die Äquivalentkonzentration bezogen auf das potenteste Toxin. Voraussetzung ist der parallele Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve von der Referenzverbindung und der zu untersuchenden Verbindung. Dementsprechend müssen sowohl der untere als auch der obere Plateauwert übereinstimmen. Zur Berechnung der toxischen Äquivalentkonzentration werden Toxizitäts-Äquivalentfaktoren benötigt, die sich aus dem Quotienten aus Effektkonzentration einer Referenzverbindung zur Effektkonzentration des Analyten ergeben. Die Toxizitäts-Äquivalentkonzentration einer Mehrkomponentenmischung ergibt sich, bei Annahme der Konzentrationsadditivität, aus der Aufsummierung der Einzelstoffkonzentrationen multipliziert mit ihren jeweiligen Toxizitäts-Äquivalentfaktoren (Escher et al., 2008a).

Um verschiedene endokrine Disruptoren zu vergleichen, bzw. um die gesamte estrogen Wirkung einer Probe bewerten zu können, wird für die estrogen wirksamen Disruptoren die Estradiol-Äquivalentkonzentration (estrogen equivalent concentration, EEQ), d.h. die estrogen Aktivität, angegeben. E2 ist als Positivkontrolle für die estrogen Wirkung allgemein anerkannt (Coldham et al. 1997). Mittels Estradiol-Äquivalentfaktor (EEF) und

EEQ können die Ergebnisse der chemischen Analytik mit denen des YES-Assays verglichen werden.

Ein Review von Kortenkamp (2007) zeigt, dass für Mischungen von estrogen wirksamen Reinstoffen das Konzept der Konzentrationsadditivität aufgeht. Jedoch können in Realproben auch nicht estrogen wirksame Substanzen Einfluss auf die Wirkung der vorhandenen endokrinen Disruptoren nehmen. Frische et al. (2009) führen drei mechanistisch mögliche Effekte auf: Toxische Maskierung, antagonistische Modulation sowie synergistische Modulation. Um diese Effekte für den YES-Assay zu quantifizieren, ist der Vergleich mit der chemischen Analytik sowie die Untersuchung auf Matrixeffekte notwendig.

### **Ermittlung der Bestimmungsgrenze des L-YES**

Mittels L-YES-Assay wird die estrogen Aktivität als Summenparameter erfasst. Zur Darstellung der Ergebnisse wird das Prinzip der EEQ genutzt, das die EC50-Werte immer zu den EC50-Werten der potentesten Substanz – in diesem Falle E2 – ins Verhältnis setzt. Bei jedem Ansatz des YES wird immer eine E2-Kontrolle mitgeführt, die zur Ermittlung der EEQ von unbekanntem Proben genutzt wird. Die Bestimmungsgrenze des L-YES wurde zu Beginn des Projektes durch eine 24-fache Vermessung des E2-Standards ermittelt und beträgt  $11,5 \pm 2,9$  ng/L.

## **4.7. Untersuchung von Modellsubstanzen**

Zur Validierung des YES-Assays wurden neben dem natürlichen Steroidhomon E2 neun weitere Substanzen ausgewählt. Die Modellsubstanzen wurden in 2 mL Schraubverschluss-Probenflaschen auf der Feinwaage eingewogen und im Anschluss in Ethanol (absolut für Analyse, Merck) gelöst. Nach der vollständigen Lösung wurde eine Verdünnungsreihe in halben log-Stufen durchgeführt. Die untersuchten Substanzen sowie die untersuchte Konzentrationsbereiche können Tab. 7 entnommen werden.

**Tab. 7: Untersuchte Modellsubstanzen und Konzentrationsbereiche**

Substanz	Konzentrationsbereich in mol/L
17β-Estradiol	1E-5 bis 1E-12
17α-Ethinylestradiol	1E-8 bis 1E-12
Estriol	1E-7 bis 1E-11
Mestranol	1E-6 bis 1E-11
BPA	1E-4 bis 1E-9
4-n-Nonylphenol	1E-4 bis 1E-7
BBP	1E-3 bis 1E-7
Endosulfan {α:β=2:1}	1E-4 bis 1E-7
4-tert.-Octylphenol	1E-3 bis 1E-7
2-Hydroxybiphenyl	1E-3 bis 1E-7

Die EC50-Werte der Modellsubstanzen, d.h. die Effektkonzentrationen mit halbmaximalem Ausschlag, erstrecken sich über fünf Dekaden. Die niedrigste EC50 hat E2 mit 1,7E-10 mol/L bzw. 46 ng/L. Die BG für E2 liegt bei  $4,2 \pm 1,1E-11$  mol/L bzw.  $11,5 \pm 2,9$  ng/L.

Die natürlichen sowie die synthetischen Hormone besitzen eine um zwei bis vier Dekaden niedrigere EC50 als die übrigen Substanzen. In Tab. 8 sind die Werte mit Standardabweichung (STABW) und Anzahl der Bestimmungen aufgeführt. Für die Substanz Endosulfan konnte keine Färbung im YES-Assay gemessen werden, und somit auch keine estrogenere Aktivität für den getesteten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der eingeschränkten Löslichkeiten nicht vermessen werden.

**Tab. 8: Mittelwerte der EC50-Werte, STABW und EEF der gemessenen Modellsubstanzen**

Substanz	EC50 in mol/L	EC50 in ng/L	STABW in %	EEF	Bestimmungen
E2	$1,7 \pm 0,7E-10$	$46 \pm 19$	41	1,0E+00	24
EE2	$1,9 \pm 0,7E-10$	$56 \pm 21$	37	8,9E-01	3
E3	$2,5 \pm 1,0E-08$	$7,2 \pm 2,9E+02$	40	6,8E-03	6
MeEE2	$3,7 \pm 1,6E-08$	$1,1 \pm 5,0E+03$	43	4,6E-03	3
BPA	$2,5 \pm 0,7E-06$	$5,7 \pm 1,6E+05$	28	6,8E-05	5
4-n-NP	$2,1 \pm 1,0E-05$	$4,6 \pm 2,2E+06$	48	8,1E-06	5
OP	$6,9 \pm 4,3E-05$	$1,4 \pm 0,9E+07$	63	4,6E-06	2
BBP	$4,7 \pm 1,2E-05$	$1,5 \pm 3,7E+06$	26	3,6E-06	3
2-HBP	$4,8 \pm 1,0E-04$	$8,1 \pm 1,6E+07$	20	6,5E-07	2
ES	keine Färbung	keine Färbung	-	-	3

Der Vergleich der EC50-Werte des L-YES-Assays mit Literaturdaten ist nicht ohne Weiteres möglich, da zahlreiche sehr ähnliche Assays auf Hefebasis durchgeführt werden, die sich in der Modifikation der Hefe, den genutzten Chemikalien und den Inkubationszeiten unterscheiden. Zum einfachen Vergleich der gemessenen EC50-Werte mit geeigneten Literaturdaten wurde der Quotient aus der gemessenen EC50 und der Literatur-EC50 gebildet und in Tab. 9 aufgeführt.

**Tab. 9: Vergleich der ermittelten EC50-Werte der Modellsubstanzen mit Literaturdaten**

Substanz	EC50 in mol/L	STABW in %	EC50 (diese Studie)/ EC50 (Literatur)	Quelle
E2	4,8 ± 1,0E-11	21	3,5	Schultis et al., 2004
E2	3,6E-10	-	0,5	Sanseverino et al., 2009
E2	0,5E-09-1,0E-09	-	0,17-0,34	Bovee et al., 2004
EE2	6,6 ± 1,9E-11	29	2,9	Schultis et al., 2004
E3	1,2E-07	-	0,21	Bovee et al., 2004
MeEE2	9,1E-09	-	4,1	Bovee et al., 2004
4-n-NP	4,2 ± 1,3E-06	31	5,0	Schultis et al., 2004
BPA	1,3 ± 0,3E-06	23	1,9	Schultis et al., 2003
BBP	4,7E-05	-	1,0	Sanseverino et al., 2009

Ein Quotient der EC50-Werte von etwa 0,5 bis 2 kann im Rahmen der Messgenauigkeit als nicht signifikante Abweichung vernachlässigt werden. Schultis et al. (2004) nutzten die gleiche auf Routledge und Sumpter (1996) zurückgehende Hefe und haben die Lytikase-Spaltung eingeführt (L-YES). Bovee et al. (2004) nutzten den YES-Assay mit einer selbst modifizierten Hefe und Sanseverino et al. (2009) setzten eine Hefe ein, die bei estrogener Aktivität bioluminesziert. Zwar beruhen beide Assays ebenfalls auf der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die mit dem menschlichen Estrogenrezeptor  $\alpha$  ausgestattet wurde, es werden jedoch grundsätzlich verschiedene Signalkaskaden genutzt. Die große Spannweite der Quotienten zu Bovee et al. (2004) könnte auf diesen Zusammenhang zurückzuführen sein.

Es konnte keine Veröffentlichung gefunden werden, die mit dem YES-Assay ermittelte Werte für alle Modellsubstanzen liefert.

Für ES waren keine mit dem YES-Assay ermittelten Literaturdaten auffindbar. Es gibt jedoch Ergebnisse mit dem E-Screen. Lediglich Körner et al. (2001) geben an, dass  $\alpha$ -ES genutzt wurde. In den übrigen Veröffentlichungen fehlt die Angabe, welches Stereoisomer bzw. welche Mischung genutzt wurde. Die EC50-Werte liegen zwischen 4,0E-8 mol/L und 2,0E-7 mol/L (Andersen et al., 2002; Fang et al., 2000; Leusch et al., 2010; Körner et al., 2001). Im Rahmen dieser Studie wurde eine Mischung im Verhältnis  $\alpha$ : $\beta$ =2:1 genutzt und

Konzentrationen zwischen 1E-4 mol/L und 1E-7 mol/L untersucht. Möglicherweise weisen die unterschiedlichen Stereoisomere unterschiedliche estrogenen Potenz auf, weshalb keine Aktivität durch den L-YES-Assay festgestellt werden konnte. Eine andere Möglichkeit ist die toxische Maskierung. Dabei wird die estrogenen Aktivität durch die höhere Toxizität im L-YES-Assay maskiert.

#### 4.8. Prüfung von Matrixeffekten

Zur Ermittlung von möglichen Matrixeffekten wurden unterschiedliche Proben mit E2, EE2 und BPA dotiert. Dazu wurden Konzentrationen nahe der BG (EC10) sowie mit maximalem Ausschlag (EC100) gewählt. Hierzu wurden als Realproben Oberflächenwasser aus dem Rhein bei Karlsruhe und bei Düsseldorf, Wasser aus der Donau bei Ulm sowie ein Rohwasser genutzt. Die Proben wurden nicht stabilisiert und bei 4 °C gelagert.

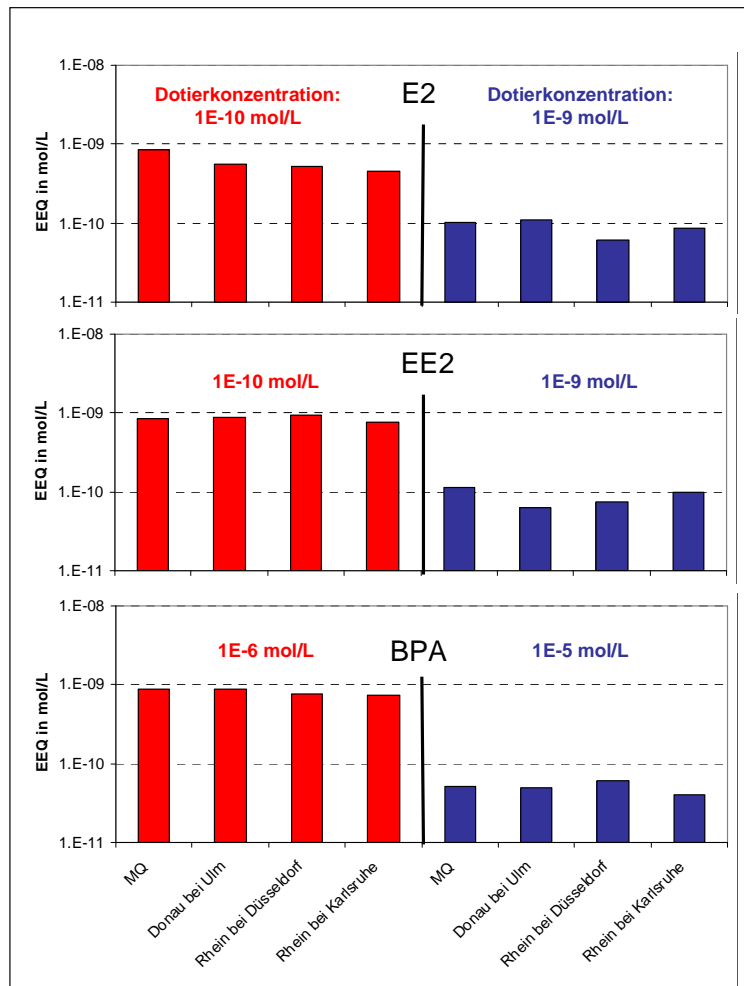
Die Dotierung der Wasserproben erfolgte mit den in Tab. 10 angegebenen Konzentrationen. Um eine eventuelle Abweichung der Dotierlösung zu ermitteln, wurde zusätzlich zu den Wasserproben Reinstwasser dotiert.

Tab. 10: Angabe der Dotierkonzentration und der entsprechenden  $EEQ_{\text{berechnet}}$

Substanz	Dotierkonzentration in mol/L	EEF	$EEQ_{\text{berechnet}}$ in mol/L
BPA	1,0E-05	6,8E-05	6,8E-10
BPA	1,0E-06	6,8E-05	6,8E-11
E2	1,0E-09	1,0E+00	1,0E-09
E2	1,0E-10	1,0E+00	1,0E-10
EE2	1,0E-09	8,9E-01	8,9E-10
EE2	1,0E-10	8,9E-01	8,9E-11

##### 4.8.1. Prüfung von Matrixeffekten in Oberflächenwässern

Die Ergebnisse der Untersuchung von Matrixeffekten in Oberflächenwasserproben sind in Abb. 11 und Tab. 11 zusammengestellt.



**Abb. 11:** Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Oberflächenwasserproben

**Tab. 11: Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Oberflächenwasserproben**

Probe	Dotier- substanz	EEQ <sub>berechnet</sub> in mol/L	EEQ <sub>gemessen</sub> in mol/L	EEQ <sub>gemessen</sub> / EEQ <sub>berechnet</sub>	STABW in %	Bestimmungen
MilliQ-Wasser	E2	1,0E-09	8,4E-10	0,8	20	3
Trinkwasseraufbereiter	E2	1,0E-09	8,6E-10	0,9	20	4
Rhein bei Düsseldorf	E2	1,0E-09	5,5E-10	0,6	40	4
Rhein bei Karlsruhe	E2	1,0E-09	5,2E-10	0,5	51	4
Donau bei Ulm	E2	1,0E-09	4,6E-10	0,5	85	4
MilliQ-Wasser	E2	1,0E-10	1,0E-10	1,0	24	2
Trinkwasseraufbereiter	E2	1,0E-10	1,0E-10	1,0	-	1
Rhein bei Düsseldorf	E2	1,0E-10	1,1E-10	1,1	-	1
Rhein bei Karlsruhe	E2	1,0E-10	6,1E-11	0,6	-	1
Donau bei Ulm	E2	1,0E-10	8,7E-11	0,9	-	1
MilliQ-Wasser	EE2	8,9E-10	8,6E-10	1,0	18	3
Trinkwasseraufbereiter	EE2	8,9E-10	9,0E-10	1,0	18	3
Rhein bei Düsseldorf	EE2	8,9E-10	8,8E-10	1,0	17	3
Rhein bei Karlsruhe	EE2	8,9E-10	9,5E-10	1,1	18	3
Donau bei Ulm	EE2	8,9E-10	7,7E-10	0,9	18	3
MilliQ-Wasser	EE2	8,9E-11	1,1E-10	1,3	21	2
Trinkwasseraufbereiter	EE2	8,9E-11	8,8E-11	1,0	-	1
Rhein bei Düsseldorf	EE2	8,9E-11	6,3E-11	0,7	-	1
Rhein bei Karlsruhe	EE2	8,9E-11	7,4E-11	0,8	-	1
Donau bei Ulm	EE2	8,9E-11	9,8E-11	1,1	-	1
MilliQ-Wasser	BPA	6,8E-10	8,8E-10	1,3	17	3
Trinkwasseraufbereiter	BPA	6,8E-10	8,2E-10	1,2	5	3
Rhein bei Düsseldorf	BPA	6,8E-10	9,0E-10	1,3	13	3
Rhein bei Karlsruhe	BPA	6,8E-10	7,7E-10	1,1	16	3
Donau bei Ulm	BPA	6,8E-10	7,5E-10	1,1	9	3
MilliQ-Wasser	BPA	6,8E-11	5,2E-11	0,8	29	2
Trinkwasseraufbereiter	BPA	6,8E-11	4,3E-11	0,6	-	1
Rhein bei Düsseldorf	BPA	6,8E-11	4,9E-11	0,7	-	1
Rhein bei Karlsruhe	BPA	6,8E-11	6,0E-11	0,9	-	1
Donau bei Ulm	BPA	6,8E-11	4,0E-11	0,6	-	1

Für die Mehrzahl der Dotierungen entspricht, bei Berücksichtigung der assaybedingten STABW, die EEQ<sub>berechnet</sub> der EEQ<sub>gemessen</sub>. Die STABW der Mehrfachbestimmungen entspricht

der assaybedingten STABW von etwa 40 %. Geringfügig höhere Abweichungen waren nur bei der Dotierung mit E2 und einer  $EEQ_{\text{berechnet}}$  von  $1E-9$  mol/L zu beobachten.

Für die Dotierungen im EC10-Bereich zeigte sich eine größere Variation der Abweichungen. Ursache hierfür ist vor allem die Tatsache, dass die STABW nahe der BG höher ist. Abschließend kann festgestellt werden, dass im untersuchten Konzentrationsbereich für Oberflächenwasser keine bis geringfügige Matrixeffekte zu beobachten sind.

#### **4.8.2. Prüfung von Matrixeffekten in Kläranlagenproben**

Neben Oberflächenwasserproben wurden auch Proben aus der Kläranlage des Abwasserzweckverbandes Breisgauer Bucht zur Ermittlung von möglichen Matrixeffekten eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 und Abb. 12 zusammengefasst.



**Tab. 12: Ergebnisse der dotierten Proben der Kläranlage Breisgauer Bucht (unfil.: unfiltriert, fil.: filtriert)**

Probe	Dotiersubstanz	EEQ <sub>berechnet</sub> in mol/L	EEQ <sub>gemessen</sub> in mol/L	EEQ <sub>gemessen</sub> / EEQ <sub>berechnet</sub>	STABW in %	Bestimmungen
MilliQ-Wasser	E2	1,0E-09	8,2E-10	0,8	4	3
Vorklärung (unfil.)	E2	1,2E-09	1,0E-09	0,9	18	3
Vorklärung (fil.)	E2	1,2E-09	8,3E-10	0,7	29	3
Sandfilter (unfil.)	E2	1,0E-09	6,6E-10	0,7	14	3
Sandfilter (fil.)	E2	1,0E-09	6,7E-10	0,7	24	3
MilliQ-Wasser	E2	1,0E-10	1,0E-10	1,0	24	2
Vorklärung (unfil.)	E2	2,8E-10	3,2E-10	1,2	6	2
Vorklärung (fil.)	E2	2,5E-10	3,1E-10	1,3	40	2
Sandfilter (unfil.)	E2	1,0E-10	1,6E-10	1,6	4	2
Sandfilter (fil.)	E2	1,0E-10	2,8E-10	2,8	9	2
MilliQ-Wasser	EE2	8,9E-10	8,7E-10	1,0	22	3
Vorklärung (unfil.)	EE2	1,1E-09	1,1E-09	1,0	46	3
Vorklärung (fil.)	EE2	1,0E-09	6,5E-10	0,6	28	3
Sandfilter (unfil.)	EE2	8,9E-10	6,7E-10	0,8	8	3
Sandfilter (fil.)	EE2	8,9E-10	6,3E-10	0,7	28	3
MilliQ-Wasser	EE2	8,9E-11	1,1E-10	1,3	21	2
Vorklärung (unfil.)	EE2	2,7E-10	2,7E-10	1,0	21	2
Vorklärung (fil.)	EE2	2,4E-10	2,5E-10	1,0	55	2
Sandfilter (unfil.)	EE2	8,9E-11	1,8E-10	2,0	8	2
Sandfilter (fil.)	EE2	8,9E-11	2,3E-10	2,6	13	2
MilliQ-Wasser	BPA	6,8E-10	8,4E-10	1,2	8	2
Vorklärung (unfil.)	BPA	8,6E-10	1,0E-09	1,2	18	2
Vorklärung (fil.)	BPA	8,3E-10	8,5E-10	1,0	17	2
Sandfilter (unfil.)	BPA	6,8E-10	8,0E-10	1,2	11	2
Sandfilter (fil.)	BPA	6,8E-10	7,2E-10	1,1	2	2
MilliQ-Wasser	BPA	6,8E-11	5,2E-11	0,8	29	2
Vorklärung (unfil.)	BPA	2,5E-10	2,1E-10	0,8	21	2
Vorklärung (fil.)	BPA	2,2E-10	2,6E-10	1,2	2	2
Sandfilter (unfil.)	BPA	6,8E-11	2,0E-10	3,0	17	2
Sandfilter (fil.)	BPA	6,8E-11	2,0E-10	3,0	49	2

Die STABW der Mehrfachbestimmungen entspricht der assaybedingten STABW von etwa 40 %. Für die Dotierungen zeigt sich, bei Berücksichtigung der assaybedingten STABW, in der Regel eine gute Übereinstimmung zwischen der EEQ<sub>berechnet</sub> und der EEQ<sub>gemessen</sub>.

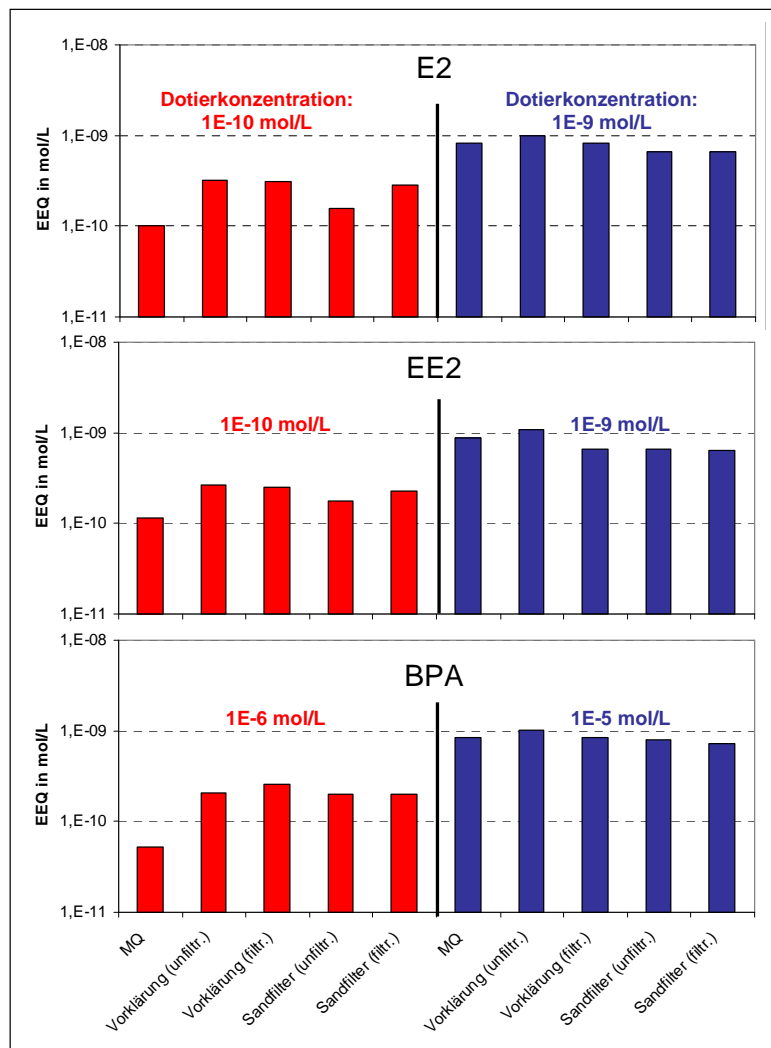
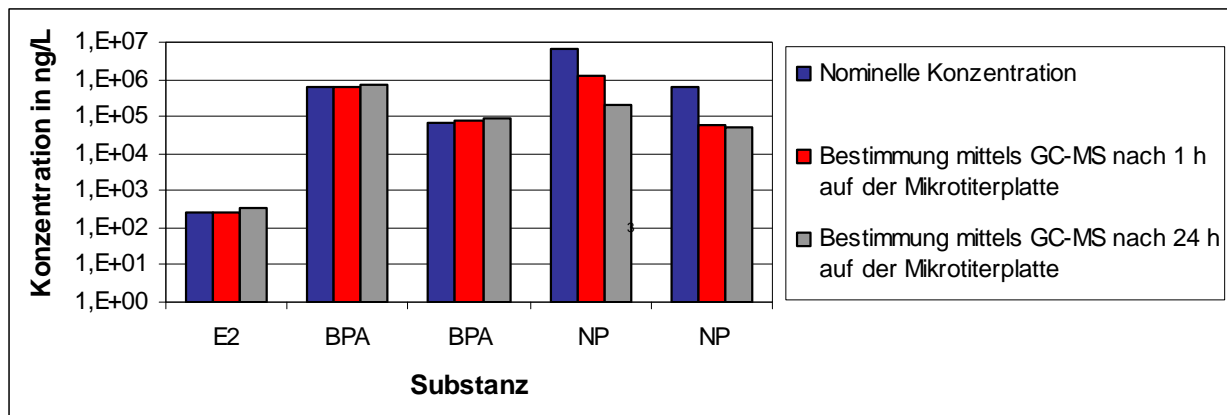


Abb. 12: Ergebnisse zur Untersuchung von Matrixeffekten in dotierten Kläranlagenproben

#### 4.9. Betrachtung der nominellen/reellen Konzentration im Assay

Im Rahmen der Evaluierung wurde geprüft, ob Substanzverluste bei der Inkubation auftreten können. Hierzu wurden entsprechend der Assay-Durchführung Mikrotiterplatten mit der nominellen Konzentration angesetzt, und die reelle Konzentration mittels chemischer Analytik bestimmt. Dazu wurden Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze sowie mit maximalem Messsignal gewählt.



**Abb. 13:** Ergebnisse zur Untersuchung der nominellen/reellen Konzentration im YES-Assay

Für Estradiol und Bisphenol A stimmen reelle und nominelle Konzentration überein. Für Nonylphenol treten deutliche Abweichungen auf, wahrscheinlich verursacht durch Adsorptionseffekte an die genutzten Kunststoffverbrauchsmaterialien. Insgesamt ist ein Substanzverlust erwartungsgemäß bei besonders hydrophoben Modellschubstanzen zu beobachten.

## 4.10. Praktische Hinweise zur Nutzung des L-YES-Assays

### 4.10.1. Reproduzierbarkeit

In Bezug auf die Reproduzierbarkeit sind zwei Punkte zu berücksichtigen. Zum einen wird bei jedem Ansatz ein E2-Standard gemessen und die Kalibrierkurve neu ermittelt. Es muss also geprüft werden, ob die Messung des Standards reproduzierbar ist. Zum anderen ist zu prüfen, ob die Kalibrierkurve des Standards auf die restlichen Platten eines Ansatzes übertragbar ist.

- **Reproduzierbarkeit in unabhängigen Ansätzen**

Die Ergebnisse der Modellschubstanzen zeigen, dass bei Einhaltung der Qualitätskriterien eine gute Reproduzierbarkeit gegeben ist.

- **Reproduzierbarkeit in einem Ansatz**

Um die Reproduzierbarkeit in einem Ansatz zu überprüfen wurde auf mindestens acht von zehn Platten die gleiche Substanz in der gleichen Konzentration gemessen. Dies wurde für den E2-Standard (siehe Abb. 14), mit E2 dotiertem MilliQ-Wasser sowie mit BPA dotiertem MilliQ-Wasser durchgeführt. Die STABW betragen 15,7 %, 6,7 % bzw. 22,0 % und liegen damit deutlich unterhalb der assaybedingten STABW von 40 %. Es ist also eine gute Reproduzierbarkeit innerhalb eines Ansatzes gegeben.

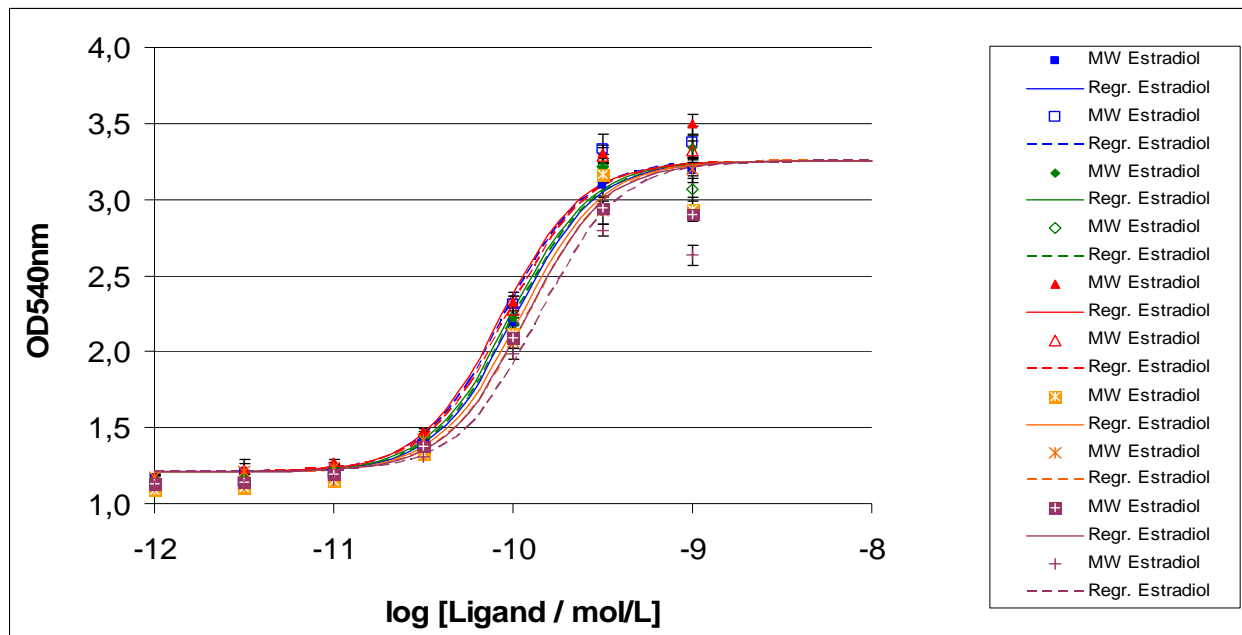


Abb. 14: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in einem YES-Ansatz

#### 4.10.2. Zelldichte

In Abb. 15 ist eine Messung mit stark variierender Zelldichte dargestellt. Abgebildet sind die MW der achtfachen Bestimmung sowie die Regressionskurve (Regr.) für die entsprechenden Daten. Der Abb. 15 können die EC50 dieser Messung entnommen werden. Es zeigt sich eine große Abweichung zwischen den Parallelansätzen.

Zur Auswertung der Ergebnisse ist es wichtig deren Berechnungsgrundlage zu kennen. Je höher die OD<sub>595nm</sub> und damit die Zelldichte, desto mehr  $\beta$ -Galaktosidase wird bei gleicher Analytkonzentration gebildet. Damit dieser Effekt keinen zu großen Einfluss auf das Messergebnis nimmt, wird die OD<sub>540nm</sub> mittels Teilung durch die OD<sub>595nm</sub> normiert. Diese Normierung ergibt aber nur bei kleinen Schwankungen der Zelldichte sinnvolle Ergebnisse.

Für die in Abb. 15 blau dargestellte Messung auf Platte 1 ist die Zelldichte bei 1,0E-8 mol/L und 3,2E-9 mol/L deutlich kleiner als bei den übrigen Messpunkten. Dadurch kommt es zu einer Überhöhung der korrigierten und normierten OD<sub>540nm</sub>. Die ungleichmäßige Zelldichte ist auch die Ursache für die Abweichungen der übrigen Platten.

Die in Abb. 15 dargestellte Messung wurde nicht zur Ermittlung der EC50 berücksichtigt. Als Qualitätskriterium wurde die Zelldichte aufgenommen. Bei Abweichungen um mehr als 20 % vom Mittelwert muss der entsprechende Messwert unberücksichtigt bleiben oder die Messung wiederholt werden.

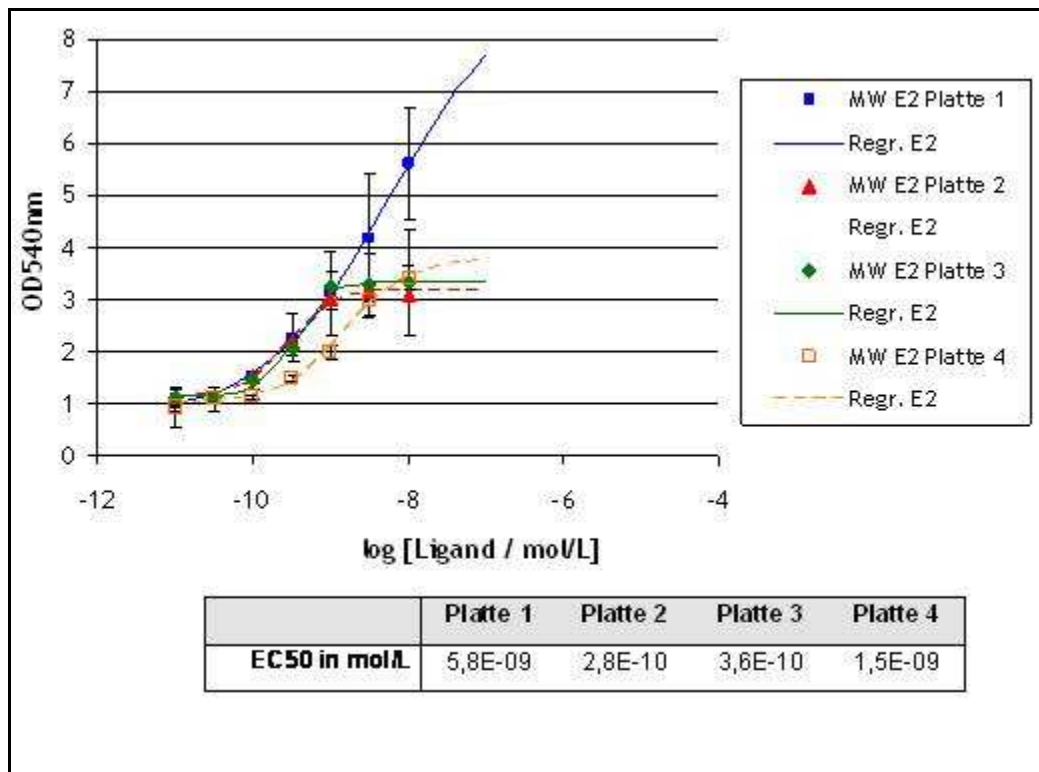


Abb. 15: Abweichungen von YES-Ergebnisse aufgrund variierender Zelldichte.

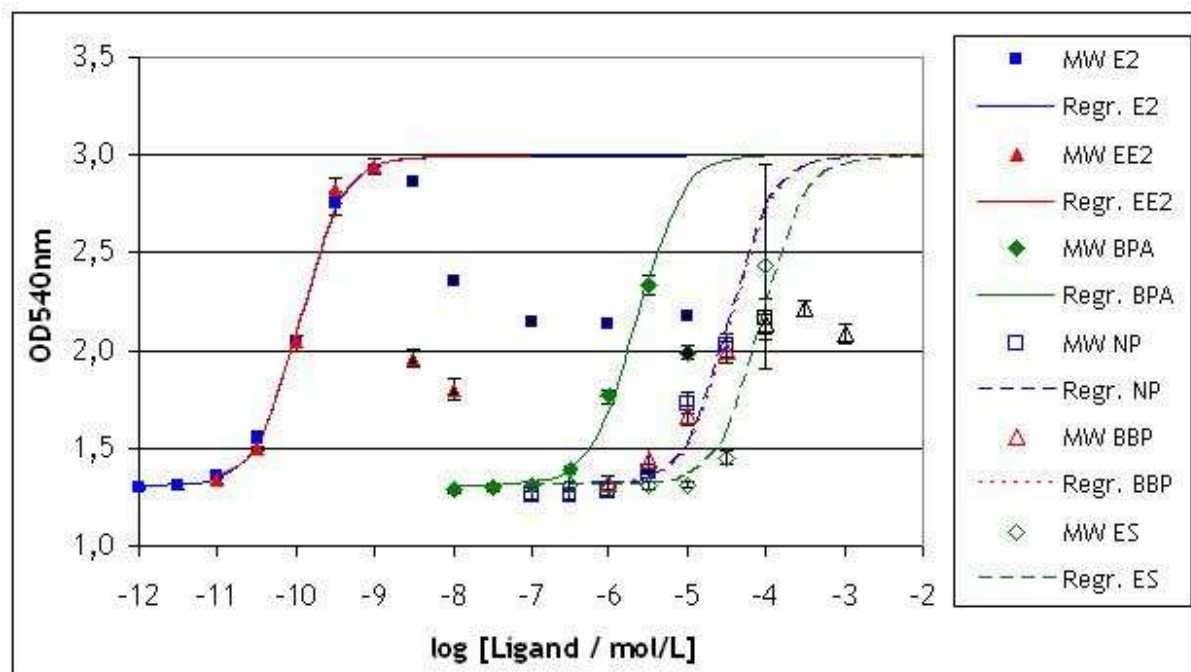
#### 4.10.3. Lytikasekonzentration

Die Durchführung des L-YES-Assays sieht eine vierstündige Inkubation mit CPRG und Lytikase vor. Innerhalb dieser Zeit findet der enzymatische Umsatz von CPRG und entsprechend der Farbumschlag von gelb nach rot statt. Die Rotfärbung wird mittels OD-Messung bei 540 nm quantifiziert. Da der Messbereich des Photometers von 0 bis 4 reicht, wird eine OD<sub>540nm</sub> der Positivkontrolle, also der höchsten Konzentration des E2-Standards, von 3,5 bis 4,0 als optimaler Messzeitpunkt angestrebt. Durch die Zugabe von Lytikase wird die Zellwand der Hefe gespalten und das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase freigesetzt. Je höher die Lytikasekonzentration, desto mehr Löcher entstehen pro Zeiteinheit in der Zellwand. Damit korreliert die Lytikasekonzentration mit der Geschwindigkeit des Farbumschlages. Innerhalb dieses Projektes wurden verschiedene Lytikasekonzentrationen getestet, und die Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang. Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine niedrigere Lytikasekonzentration um die 0,01 mg/L ( $\geq 2$  Units/L) massive Schwankungen in der Reaktionszeit verursacht. Die Ursache für diese Schwankungen liegt möglicherweise in einer inhomogenen Qualität der Lytikase. Da diese Schwankungen jedoch bei 0,095 mg/L ( $\geq 19$  Units/L) beherrschbar sind, wurde diese Konzentration für alle Messungen mit dem L-YES-

Assay genutzt. Diese Vorgabe entspricht der verwendeten Konzentration anderer Arbeitsgruppen und verkürzt die Messdauer von vier Stunden auf unter eine Stunde.

#### 4.10.4. Abnehmende EC50 bei hohen Konzentrationen

Streng genommen darf das Konzept der Äquivalentkonzentration nur angewendet werden, wenn die Dosis-Wirkungs-Kurven der Referenzverbindung und des Analyten parallel sind. Dies setzt voraus, dass sowohl der untere als auch der obere Plateauwert übereinstimmen (Escher et al., 2008a).



**Abb. 16:** Darstellung mehrerer Kurvenverläufe von Modellsubstanzen aus repräsentativen Daten. Messung zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten. Punkte die nicht für die Ermittlung der Regressionskurve berücksichtigt wurden, sind schwarz dargestellt

Abb. 16 zeigt eine Auswahl von repräsentativen Daten aus vier Messungen. Dabei ist für jede der sechs Substanzen der MW der 8-fachen Bestimmung jeder untersuchten Konzentration abgebildet. Zusätzlich sind die für E2 ermittelte Kalibrierkurve und die für die übrigen Substanzen angepassten Regressionskurven eingezeichnet. Für die meisten Substanzen steigt das Messsignal mit der Konzentration bis zu einem Maximum an und sinkt dann wieder ab. Hierfür kann es unterschiedliche Ursachen geben. Für E2 kann ab  $1\text{E-}8$  mol/L von einer akut toxischen Konzentration ausgegangen werden, da das Zellwachstum der Hefe deutlich gehemmt wird. Die Abnahme des Messwertes bereits bei einer Konzentration von  $3,2\text{E-}9$  mol/L ( $\log [\text{Ligand} / \text{mol/L}] = -8,5$ ) deutet ebenfalls auf toxische Effekte hin. Diese

beeinflussen scheinbar die Bildung der  $\beta$ -Galaktosidase, ohne Einfluss auf die Zelldichte zu nehmen.

Die Übertragung auf die übrigen Substanzen ist nicht ohne Weiteres möglich. Während EE2 einen identischen Kurvenverlauf zeigt, weisen die übrigen Substanzen größere Abweichungen auf. Bei EE2 nimmt die Zelldichte bereits bei  $3,2E-9$  mol/L ab, BPA und BBP zeigen dagegen keine Veränderung der Zelldichte im untersuchten Konzentrationsbereich. Die Zelldichte bei 4-n-NP und ES ist ab einer Konzentration von  $1,0E-4$  mol/L bzw.  $3,2E-5$  mol/L ( $\log$  [Ligand/mol/L] = -4,5) deutlich erniedrigt. Damit zeigen BPA und BBP einen von E2 abweichenden Kurvenverlauf. Die Abweichung von 4-n-NP kann entsprechend der Abnahme bei E2 mit einer Hemmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Bildung erklärt werden.

Bei der Kontrolle der Rohdaten für ES ist festzustellen, dass keine signifikante Färbung auftritt. Der Ausschlag sowie die sehr hohe STABW des Messpunktes bei  $1,0E-4$  mol/L ist auf die Normierung mit der Zelldichte zurückzuführen. Die Regressionskurve für ES ist nur zur Veranschaulichung abgebildet. Bei Einhaltung der Grenzwerte für die Zelldichte wurde keine messbare estrogenen Aktivität für Endosulfan nachgewiesen. In anderen Hefeassays, die den humanen Estrogenrezeptor verwendeten, konnte ebenfalls keine Estrogenität nachgewiesen werden. Jiao et al. (2008) konnten jedoch unter Verwendung des Goldfisch-estrogenrezeptor  $\alpha$  estrogenen Aktivität nachweisen.

#### 4.10.5. Kontrollen zur Qualitätssicherung

Ebenso wie bei der Untersuchung von Umweltproben mittels chemischer Analytik sind beim Einsatz von Biotestverfahren Maßnahmen zur Qualitätssicherung notwendig. Die wichtigste Voraussetzung bei der Untersuchung der endokrinen Aktivität mittels *in vitro* Verfahren ist ein stabiles Testsystem. Dies kann durch die Definition von Validitätskriterien und das Mitführen adäquater Kontrollen gewährleistet werden.

Standardisierte Versuchsdesigns sind für die replizierbare Datenerhebung unabdingbar (Wagner und Öehlmann, 2011b). Bisher existieren keine national oder international standardisierten *in vitro* Verfahren für die Untersuchung von endokrinen Disruptoren. Zu diesem Zweck wurde 2011 in Deutschland ein DIN-Arbeitskreis konstituiert (Normenausschuss Wasserwesen, NA 119-01-05-09 AK), der die nationale und internationale Standardisierung von Testverfahren zur Erfassung endokriner Wirkungen in der aquatischen Umwelt zum Ziel hat. Eine entsprechende Norm ist allerdings noch nicht verfügbar.

In der vorliegenden Studie wurde die Stabilität des Testverfahrens durch den konsequenten Einsatz eines laborinternen, standardisierten Protokolls (siehe Kapitel 4.6 „Durchführung des L-YES-Assay“), das intensive Training der versuchsdurchführenden Personen und die

Mitführung von Positivkontrollen, Negativkontrollen und Lösungsmittelkontrollen gewährleistet.

#### 4.10.6. Lagerung und Stabilisation

Es wurden Proben mit E2 und EE2 im EC100-Bereich ( $1,0E-09\text{mol/L}$ ) aufdotiert, um den Einfluss der Lagerung zu beurteilen. Der Abb. 17 kann die zeitliche Abnahme der EEQ für die E2 dotierten Proben entnommen werden.

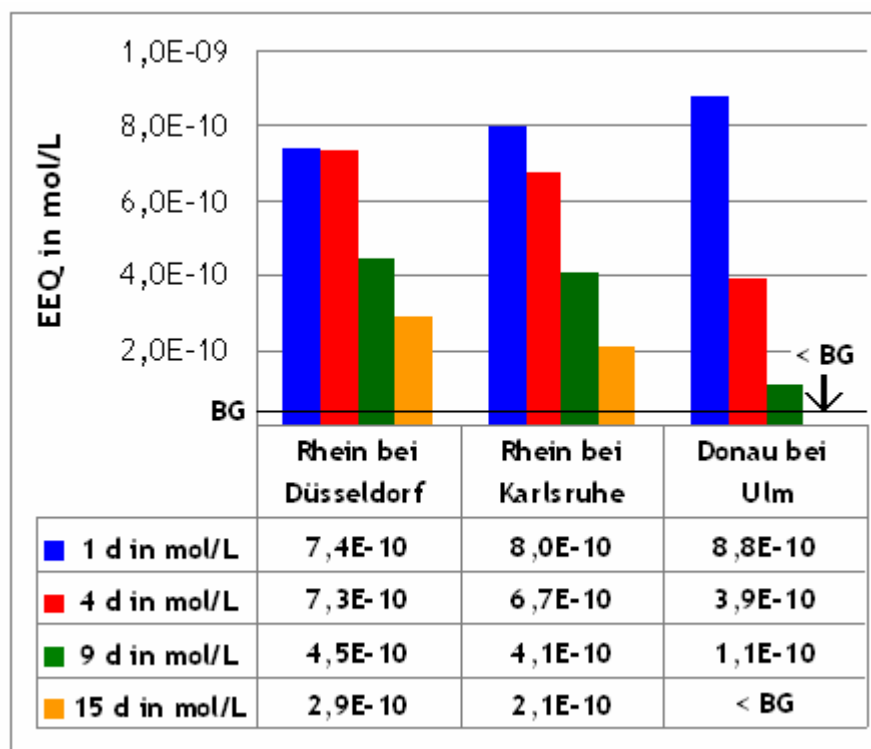


Abb. 17: Einfluss der Lagerung bei Oberflächenwasserproben (Dotierung von  $1E-9\text{ mol/L E2}$ )

Um nur die Assay-Abweichung zu ermitteln, wurde eine Teilmenge je Probe dotiert und diese innerhalb von 15 Tagen viermal vermessen. Die dotierten Proben wurden bei  $4\text{ °C}$  lichtgeschützt gelagert, jedoch nicht stabilisiert. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme der EEQ über die Lagerzeit. Als mögliche Ursachen für die Abnahme kommen der biologische Abbau, die Adsorption an das Probengefäß sowie die Verflüchtigung von E2 in Frage. Berücksichtigt man die physikalischen Eigenschaften, die in Tab. 6 im Kapitel „Material und Methoden“ zusammengefasst sind, erscheint die Verflüchtigung sehr unwahrscheinlich. Der Oktanol-Wasser-Koeffizient ist nicht viel höher als der von EE2. Bei EE2 konnte keine Abnahme der EEQ über die Zeit beobachtet werden (Daten nicht grafisch



dargestellt). Durch diese Tatsache erscheint auch die Adsorption als Ursache unwahrscheinlich. Berücksichtigt man die gute biologische Abbaubarkeit von E2 unter aeroben Bedingungen sowie die Matrix Flusswasser, ist der biologische Abbau wahrscheinlich die Ursache für die Abnahme. Die notwendigen Mikroorganismen samt Spurennährstoffen sind natürlicherweise in Flusswasser vorhanden. Eine Limitierung des Sauerstoffs kann ausgeschlossen werden. Das Abkühlen auf 4 °C führt offensichtlich zu einer Verlangsamung, aber nicht zu einer völligen Stagnation des Abbaus. Bei einer geschätzten Halbwertszeit von vier Tagen bei den untersuchten Bedingungen für E2 ist es nicht verwunderlich, dass für EE2 und BPA keine Abnahme zu beobachten ist. Beide Substanzen zeigen in Abbauversuchen deutlich höhere Halbwertszeiten als E2. Abschließend ist festzustellen, dass Proben die nicht unmittelbar gemessen werden stabilisiert werden müssen. Dazu eignet sich das Ansäuern auf einen pH kleiner 3 mit Salzsäure. Die Zugabe von toxischen Substanzen ist ungeeignet, da diese die Messung mit dem L-YES-Assay unmöglich machen würden. Die angesäuerten Proben müssen vor der Messung neutralisiert werden, da ein niedriger pH-Wert Auswirkungen auf das Wachstum der Hefezellen hat. Der enthaltene Salzgehalt der Proben hatte keine Auswirkungen auf die Messung im YES-Assay.

## **5. Untersuchung von Umweltproben mit erhöhter Konzentration**

Es wurden Proben untersucht, in denen höhere Werte für die estrogenen Wirkung zu erwarten waren. Zur Verfügung standen Proben der Kläranlage Breisgauer Bucht, der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, sowie fünf weiterer Kläranlagen im süddeutschen Raum.

Die Proben der Kläranlage des Abwasserzweckverbandes Breisgauer Bucht wurden mittels Schöpfkelle mit Becherglas bzw. aus dem automatischen Probennahmesystem entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben mit etwa 1 mL halbkonzentrierter Salzsäure (37 %, Merck) pro Liter Probe angesäuert. Im Labor (etwa drei Stunden später) wurden die pH-Werte kontrolliert und ein pH-Wert von  $2,3 \pm 0,3$  eingestellt. Von jeder Probe wurde eine Teilmenge mittels Unterdruckmembranfiltration (Supor®-450, 47 mm, 0,45 µm; Pall) filtriert.

Die Proben der Kläranlage Karlsruhe-Neureut wurden nicht stabilisiert, zeitnah gekühlt und bei unter 4 °C gelagert (Lagerung für den YES: 2-3 Tage).

Ferner wurden Proben aus fünf weiteren süddeutschen Kläranlagen im L-YES-Assay getestet. Diese Proben stammen aus laufenden Probenahmekampagnen des TZW und werden aus Gründen des Datenschutzes anonymisiert aufgelistet. Getestet wurden dabei

Zu- und Ablauf der jeweiligen Kläranlage. Die Proben wurden nicht stabilisiert und bei unter 4 °C gelagert (Probeneingang Juli 2012 bei 4°C gelagert, anschließend bei -20°C eingefroren; Messung Sept. 2012).

## 5.1. Kläranlage Breisgauer Bucht

Bei allen Proben bis auf den Zulauf handelt es sich um den Ablauf der genannten Aufbereitungsstufe.

Tab. 13: Ergebnisse für Proben der Kläranlage Breisgauer Bucht

Probenahmestelle	Parameter	Ergebnis GC-MS in ng/L	EEQ <sub>berechnet</sub> in ng/L	EEQ <sub>gemessen</sub> in ng/L
Zulauf (filtriert)	E3	180	1,22	-
	BPA	870	0,06	-
	<i>Summe</i>		1,28	35
Vorklärung (filtriert)	E3	180	1,22	-
	BPA	940	0,06	-
	<i>Summe</i>		1,29	41
Vorklärung (unfiltriert)	E3	-	-	-
	BPA	-	-	-
	<i>Summe</i>	-	-	49
Denitrifikation (filtriert)	E3	< BG	< BG	-
	BPA	280	0,02	-
	<i>Summe</i>		0,02	< 11,5
Nitrifikation (filtriert)	E3	< BG	< BG	-
	BPA	150	0,01	-
	<i>Summe</i>		0,01	< 11,5
Nachklärung (filtriert)	E3	< BG	< BG	-
	BPA	210	0,01	-
	<i>Summe</i>		0,01	< 11,5
Sandfilter (filtriert)	E3	< BG	< BG	-
	BPA	90	0,01	-
	<i>Summe</i>		0,01	< 11,5
Sandfilter (unfiltriert)	E3	-	-	-
	BPA	-	-	-
	<i>Summe</i>		-	< 11,5

In der Tab. 13 sind die Messergebnisse der Kläranlage Breisgauer Bucht zusammengefasst. Die Konzentrationen von E1, E2, EE2, MeEE2 und Norethisteron sowie OP und 4-iso-NP lagen für alle filtrierten Proben unter der Bestimmungsgrenze der GC-MS-Messung und sind aus diesem Grund nicht in der Tabelle aufgelistet.

Die BG beträgt 5 ng/L für E1, E2, E3, EE2, MeEE2 und Norethisteron sowie 25 ng/L bzw. 125 ng/L für OP und 4-iso-NP. Für Proben des Zulauf und der Denitrifikation ist die BG jeweils um Faktor 2 höher. Lediglich E3 und BPA konnten in den Proben nachgewiesen und mit 180 ng/L bzw. 90-870 ng/L quantifiziert werden. Zusätzlich zu den filtrierten Proben wurden im L-YES-Assay auch unfiltrierte Proben gemessen.

Die Ergebnisse der GC-MS, die berechnete EEQ, sowie die mit dem L-YES-Assay gemessene EEQ können Tab. 13 entnommen werden. Beide Analyseverfahren zeigen eine estrogene Aktivität im Zulauf, die erwartungsgemäß mittels Vorklärung kaum verändert wird. Im Ablauf der Denitrifikation ist die estrogene Aktivität deutlich reduziert, und bleibt in den folgenden Stufen auf sehr niedrigem Niveau. Für den L-YES sinkt die EEQ im Ablauf der Denitrifikation unter die BG von 11,5 ng/L und kann in weiteren Messungen nicht mehr quantifiziert werden.

Während der Trend der Abnahme übereinstimmt, ergibt der L-YES-Assay im Zulauf eine etwa 30-fach höhere estrogene Aktivität als die errechneten EEQ durch die Werte der GC-MS. Offenbar enthält das Abwasser weitere estrogen wirksame Substanzen, die nicht über die chemische Analytik erfasst werden.

## 5.2. Kläranlage Karlsruhe-Neureut

In der Tab. 14 sind die Messergebnisse der Kläranlage Karlsruhe-Neureut zusammengefasst. Die Konzentrationen von E1, E2, EE2, E3, MeEE2 und Norethisteron sowie 4-tert.- und Octylphenol liegen für alle Proben unter der BG der GC-MS-Messung und sind aus diesem Grund nicht in der Tabelle erfasst. Die BG beträgt bei Proben aus dem Zulauf 10 ng/L für E1, E2, E3, EE2, MeEE2 und Norethisteron sowie 50 ng/L bzw. 250 ng/L für 4-tert.-Oktylphenol und 4-iso-NP. Bei Proben aus der Belebung und dem Ablauf der Kläranlage ist die BG jeweils um den Faktor 2 kleiner. Lediglich 4-iso-NP und BPA wurden in den Proben nachgewiesen. Die Ergebnisse der GC-MS, die  $EEQ_{\text{berechnet}}$ , sowie die mit dem L-YES-Assay gemessene EEQ ( $EEQ_{\text{gemessen}}$ ) können Tab. 14 entnommen werden.

Tab. 14: **Ergebnisse für Proben der Kläranlage Karlsruhe-Neureut**

Probe- nahmestelle	Parameter	Ergebnis GC-MS in ng/L	EEQ <sub>berechnet</sub> in ng/L <sup>a</sup>	EEQ <sub>gemessen</sub> in ng/L <sup>b</sup>
Zulauf	4-iso-NP	2000	0,02	
	BPA	520	0,04	
	<i>Summe</i>		<i>0,06</i>	<i>70,3</i>
Belebung	4-iso-NP	260	<BG	
	BPA	680	0,05	
	<i>Summe</i>		<i>0,05</i>	<i>&lt; 11,5</i>
Ablauf	4-iso-NP	< 250	<BG	
	BPA	63	<BG	
	<i>Summe</i>		<i>&lt;BG</i>	<i>&lt; 11,5</i>

Beide Analyseverfahren zeigen eine estrogenen Aktivität im Zulauf. Im Ablauf ist die estrogenen Aktivität deutlich reduziert. Für den L-YES sinkt die EEQ in der Belebung unter die BG und bleibt auf diesem Niveau.

Auch hier stimmt der Trend der Abnahme überein. Der L-YES-Assay erfasst eine höhere estrogenen Aktivität als die chemische Analytik. Auch im Zulauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut befinden sich estrogen wirksamen Substanzen, die vom Messumfang der chemischen Analytik nicht erfasst wurden.

### 5.3. Weitere Kläranlagen

In der Tab. 15 sind die Messergebnisse fünf weiterer süddeutscher Kläranlagen zusammengefasst. Die Konzentrationen von E1, E2, EE2, E3, Norethisteron und MeEE2 liegen für alle Proben unter der BG der GC-MS-Messung. Die BG liegen im selben Bereich, wie bei der Kläranlage Karlsruhe-Neureut. Die Industriechemikalien 4-iso-NP, OP und BPA konnten in den Proben nachgewiesen werden.

**Tab. 15: Ergebnisse für Proben weiterer Kläranlagen**

Probe- nahmestelle	Parameter	Ergebnis GC-MS in ng/L	EEQ <sub>berechnet</sub> in ng/L <sup>a</sup>	EEQ <sub>berechnet</sub> in ng/L <sup>b</sup>	EEQ <sub>gemessen</sub> in ng/L
Zulauf 1	BPA	1900	0,129		
	4-iso-NP	390	0,003		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,13</i>	< 19,6	31,1
Ablauf 1	BPA	120	0,008		
	4-iso-NP	150	0,001		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,009</i>	< 9,8	< 11,5
Zulauf 2	BPA	2000	0,136		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,14</i>	< 19,6	< 11,5
Ablauf 2	BPA	190	0,013		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,01</i>	< 9,8	< 11,5
Zulauf 3	BPA	640	0,044		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,04</i>	< 19,5	14,7
Ablauf 3	BPA	76	0,005		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,01</i>	< 9,7	< 11,5
Zulauf 4	BPA	650	0,042		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,04</i>	< 19,5	< 11,5
Ablauf 4	BPA	26	0,001		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,001</i>	< 9,7	< 11,5
Zulauf 5	BPA	900	0,061		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	270	0,001		
	<i>Summe</i>		<i>0,06</i>	< 19,5	< 11,5
Ablauf 5	BPA	44	0,003		
	4-iso-NP	< BG	< BG		
	tert-OP	< BG	< BG		
	<i>Summe</i>		<i>0,003</i>	< 9,7	< 11,5

<sup>a</sup> Ergebnis GC-MS in ng/L multipliziert mit dem jeweiligen EEF

<sup>b</sup> Ergebnis GC-MS in ng/L bzw. BG in ng/L multipliziert mit dem jeweiligen EEF nahe der BG

Im Zulauf aus zwei Kläranlagen wurde eine estrogene Aktivität im L-YES-Assay nachgewiesen. Bei allen anderen Proben lag die gemessene EEQ unter der BG von

11,5 ng/L. Die Werte der GC-MS-Messungen zeigen eine Abnahme der Konzentration von BPA, 4-iso-NP und OP durch die Behandlung in den Kläranlagen.

In den Proben der Kläranlagen 1 und 3 konnte eine Abnahme der estrogenen Aktivität mittels L-YES-Assay nachgewiesen werden. Dieser Trend stimmt mit den Werten aus der GC-MS überein.

## 5.4. Diskussion

Im Rahmen der chemischen Analytik werden ausgewählte estrogenen Substanzen quantifiziert. Bei diesen handelt es sich um Substanzen, die aufgrund ihrer zu erwartenden Konzentration und Potenz den Hauptanteil der estrogenen Aktivität ausmachen sollen. Zu diesen Substanzen zählen E1, E2, E3, EE2, MeEE2 sowie die Industriechemikalien BPA und 4-iso-NP. Zudem wird mit der chemischen Analytik Norethisteron, ein Arzneistoff der zur Verhütung eingesetzt wird, sowie OP, ein Abbauprodukt von nichtionischen Tensiden, erfasst.

Unerwarteter Weise ist als einziges Steroidhormon E3 im Zulauf der Kläranlage Breisgauer Bucht zu finden. Der Mini-Review von Combalbert (2010) führt zahlreiche Veröffentlichungen auf, in welchen E1, E2 und zum Teil E3 und EE2 im Zulauf unterschiedlicher Kläranlagen quantifiziert wurden. Da E1, E2 und E3 gemeinsam durch den Urin des Menschen ausgeschieden werden, ergeben sich in der Regel Konzentrationsbereiche von 30-80 ng/L, 5-30 ng/L und 80-300 ng/L. Obwohl sich E3 in einem typischen Konzentrationsbereich befindet, liegen die Konzentrationen von E1 und E2 in dieser Studie unterhalb der BG von 1 ng/L. Combalbert (2010) führen auch verschiedene Abbauewege auf. E3 kann zwar aus E1 gebildet werden, jedoch wird dieser Abbaueweg Algen zugesprochen und ist damit eher unwahrscheinlich. Czajka et al. (2006) stellten zudem fest, dass E3 ebenfalls ein Metabolit des E2-Abbaus sein kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben dem Hormon E3, BPA und die zwei Alkylphenole 4-iso-NP und OP nachgewiesen wurden. Die gemessenen Maximalkonzentrationen waren 2000 ng/L BPA, 2000 ng/L 4-ISO-NP und 270 ng/L OP im Zulauf der Kläranlagen, sowie 190 ng/L BPA und 150 ng/L 4-ISO-NP im Ablauf der Kläranlagen. Diese Ergebnisse belegen einen unvollständigen Abbau für diese drei Substanzen.

Die Daten legen nahe, dass in der Vorklärung keine Aktivitätsminderungen durch Sorptionsprozesse auftreten. Der leicht höhere Wert von BPA liegt wahrscheinlich an schwankenden Konzentrationen im Zulauf. Die Probenahme aus dem immer identischen Volumenanteil („mit der Welle“) war in der Kläranlage nicht möglich. Darauf beruht wahrscheinlich auch der Anstieg der BPA-Konzentration zwischen Ablauf Nitrifikation und Ablauf Nachklärung.

Insgesamt entspricht die Elimination von E3 und BPA den Literaturdaten für den Abbau (Combalbert, 2010; Kang et al., 2006; Klaus et al., 2008). Die Ergebnisse des L-YES-Assays bestätigen die Abnahme der estrogenen Aktivität während der Klärung.

Die hohe estrogenen Aktivität von über 70 ng/L, die Pawlowski et al. (2004) im Ablauf zweier deutscher Kläranlagen bestimmt haben, kann für die hier untersuchten Kläranlagen nicht bestätigt werden. Ein starker Einfluss durch das jeweilige Einzugsgebiet der Kläranlage ist wahrscheinlich. Zum Beispiel konnten Escher et al. (2008b) mittels L-YES-Assay bis zu 123,4 ng/L im Zulauf, 1,1 ng/L nach der biologischen Reinigungsstufe und 1,2 ng/L im Ablauf einer deutschen Kläranlage messen. Escher et al. (2008b) untersuchten dieselbe Kläranlage zu zwei weiteren Zeitpunkten, was Ergebnisse im Zulauf bis zu 43,3 ng/L, nach der biologischen Stufe 1,0 ng/L und im Ablauf von 2,7 ng/L lieferte.

Für die Differenz zwischen  $EEQ_{\text{gemessen}}$  und  $EEQ_{\text{berechnet}}$  sind höchstwahrscheinlich Substanzen verantwortlich, die nicht durch die chemische Analytik erfasst werden. Eine weitere Ursache könnten synergistische Effekte darstellen, die jedoch bei einer einfachen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung unwahrscheinlich sind. Pawlowski et al. (2004) untersuchten ebenfalls Proben aus zwei verschiedenen Kläranlagen in Deutschland mittels L-YES-Assay und zusätzlich mittels chemischer Analytik. Sie bestimmten die  $EEQ_{\text{gemessen}}$  und ermittelten den  $EEQ_{\text{berechnet}}$  aus Werten von bekannten Estrogenen und Phytoestrogenen. Nachgewiesen wurden 66 ng/L bzw. 34 ng/L mittels L-YES und ein EEQ bis zu 18,1 ng/L bzw. 2,6 ng/L aus den analytischen Werten. Pawlowski et al. (2004) erklären dies ebenfalls durch den begrenzten Messumfang ihrer analytischen Methoden.

## 6. Aufkonzentrierung von Wasserproben

In stark kontaminierten Proben wie z.B. Kläranlagenzulauf liegen die Substanzen in relativ hohen Konzentrationen vor, so dass bei diesen Proben auf einen Anreicherungsschritt verzichtet werden kann. Aufgrund der teilweise sehr niedrigen Stoffkonzentrationen der Analyten in den aquatischen Kompartimenten bis hinab in den pg/L-Bereich wäre eine zusätzliche Anreicherung der Stoffe sinnvoll.

Für die Extraktion von flüssigen Proben kann prinzipiell die Flüssig-fest-Anreicherung (Festphasenextraktion) und die Flüssig-flüssig-Anreicherung eingesetzt werden (Ausschütteln mit Extraktionsmittel). Das Extraktionsmittel muss auf die zu untersuchenden Substanzen und Umweltmatrices in Hinblick auf Wiederfindung, Reproduzierbarkeit und Leistungsfähigkeit abgestimmt werden.

Zur Anreicherung von Spurenbestandteilen aus biologischen Matrices wird häufig die Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan (Wahlberge et al., 1990; Shin et al., 2001;

Rinken, 2002; Cathum et al., 2001) oder Ethylacetat (Mol et al., 2000) angewendet oder auf den Gebrauch unterschiedlicher Festphasen zurückgegriffen. Bei der Extraktion von großvolumigen Wasserproben im Bereich von 500 mL bis 10 L hat die Festphasenextraktion die Flüssig-flüssig-Verteilung weitgehend verdrängt. Die Festphasenextraktion kommt in den letzten zehn Jahren z.B. verstärkt in der Analytik von Xenobiotika wie den phenolischen Umwelthormonen aus wässrigen Matrices zum Einsatz (Belfroid et al., 1999; Blackburn et al., 1995; De Voogt et al., 1997; Di Corcia et al., 1994; Heberer et al., 1997; Stumpf et al., 1996; Ternes et al., 1999). Dabei bedient man sich Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften und Selektivitäten bezüglich der Analyten. Universell werden Festphasen auf Basis modifizierter Kieselgele wie die Umkehrphasen mit nC8- oder nC18-, Cyanopropyl- oder Phenylgruppen eingesetzt. Daneben wurden eine Reihe spezieller Sorbentien entwickelt, die eine hohe Affinität und Kapazität für bestimmte Verbindungsklassen wie Pestizide oder PCB aufweisen. Vermehrt Anwendung finden heute polymere Sorbentien aus der XAD-Gruppe oder Isolute ENV+, die Polystyrol-Divinylbenzol-Polymere (PS-DVB) beinhalten. Bei LiChrolut EN handelt es sich ebenfalls um ein PS-DVB-Polymer, jedoch mit höherem und definierterem Vernetzungsgrad.

Um endokrin wirksame Substanzen auch in sehr geringen Konzentrationen in Wasserproben nachweisen zu können, sollen die in der Probe enthaltenen endokrinen Substanzen quantitativ angereichert werden. Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, welche Methode am besten für die Anreicherung von endokrin wirksamen Substanzen geeignet ist. Dabei lag die Präferenz auf der Festphasenextraktion (solid phase extraction = SPE), da diese auch in der Regel für die chemische Analytik eingesetzt wird.

## 6.1. Methodik

Die SPE besteht im Allgemeinen aus 4 Schritten (siehe Abb. 19):

1. *Konditionieren der Säule*
2. *Probenauftrag*
3. *Waschen der Säule*
4. *Elution der Probe*

### **1. Konditionieren der Säule:**

Das Konditionieren dient zum Quellen des Säulenmaterials und erfolgt mit dem späteren Elutionsmittel, d.h. es werden zweimal 2,5 mL Methanol auf die Kartusche gegeben. Anschließend wird das Säulenmaterial mit einer probenähnlichen Lösung konditioniert. Hierzu werden zweimal 2,5 mL Leitungswasser (pH < 3) auf die Säule aufgetragen.



## 2. Probenauftrag:

Es werden 100 mL Probe auf die Säule gegeben. Je nach Anreicherungsfaktor kann ein geringeres oder höheres Volumen an Probe verwendet werden. Die Probe sollte mit einem konstanten Fluss von 10 mL pro Minute über die Säule laufen.

## 3. Waschen der Säule

Die Säule wird mit 2,5 mL Leitungswasser (pH < 3) gewaschen und anschließend mittels Vakuum 30–50 min getrocknet.

## 4. Elution der Probe

Eluiert wird die Probe in ein Reagenzglas durch die viermalige Aufgabe von 2,5 mL Methanol. Das Eluat wird bei 30 °C unter Stickstoffstrom eingeeengt und in der entsprechenden Menge MilliQ-Wasser (+ 5% Methanol, hier: 9,5 mL MilliQ-Wasser + 0,5 mL Methanol) aufgenommen. Die Zugabe an Ethanol soll die Löslichkeit der angereicherten Stoffe garantieren. Vorversuche haben gezeigt, dass ein Anteil von 5% Ethanol keine Auswirkung auf das Wachstum der Hefezellen im L-YES-Assay zeigt.

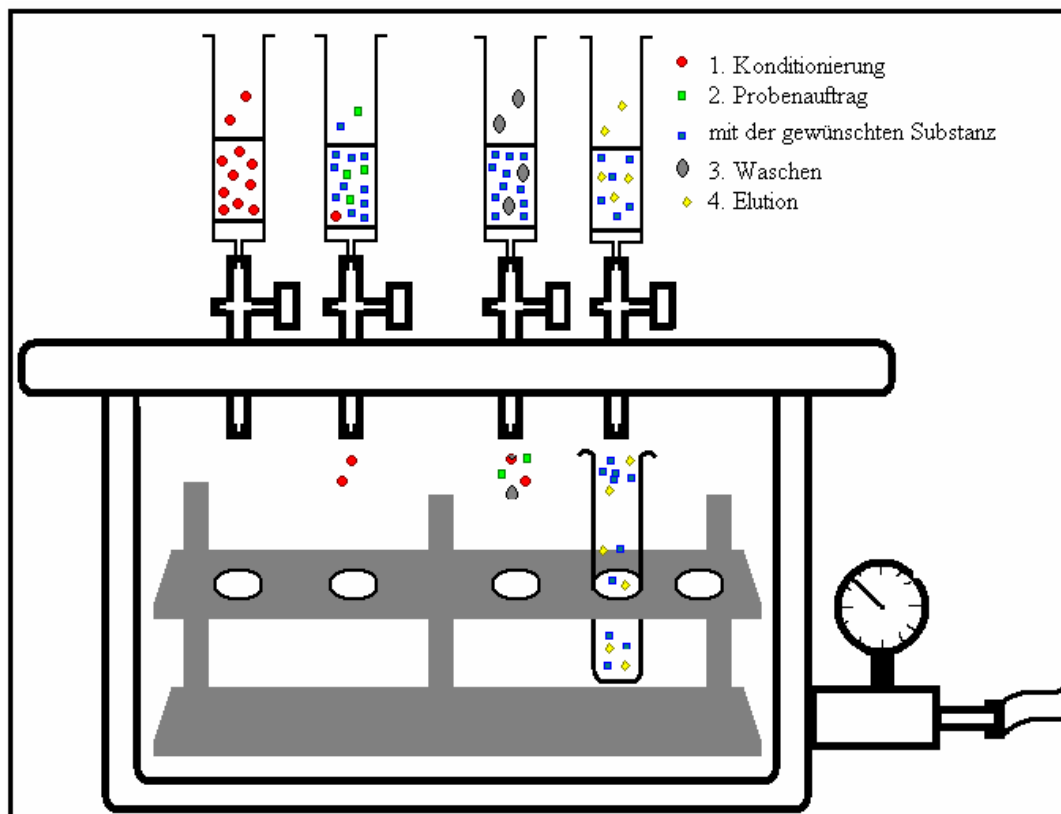


Abb. 18: Schema einer SPE

Für die Etablierung der Anreicherung estrogener Stoffe mittels SPE wurden verschiedene Festphasen getestet (s. Tab. 16).

**Tab. 16: Verwendete Festphasen**

Bezeichnung	Firma	Typ	Material
<b>SDB-1</b>	J.T. Baker®	polymere Umkehrphase	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer
<b>Bond Elut PPL</b>	Varian®	polymere Umkehrphase	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer
<b>Strata™ X</b>	Phenomenex®	polymere Umkehrphase	aromatisches Grundgerüst mit einem N-Vinylpyrrolidon-Rest
<b>Strata™ X-T</b>	Phenomenex®	polymere Umkehrphase	aromatisches Grundgerüst mit einem N-Vinylpyrrolidon-Rest und Teflonbeschichtung
<b>C18-E</b>	Phenomenex®	kieselgelbasierte Umkehrphase	Kieselgelgerüst mit Octadecylketten (C18) und gekappte Silanolgruppen

## 6.2. Chemische Analytik

In ersten orientierenden Versuchen wurde zunächst die Wiederfindung der Substanzen nach Aufkonzentrierung ermittelt. Dazu wurden alle Säulenmaterialien verglichen. Die Bestimmung wurde mittels HPLC-DAD vorgenommen.

Es wurde MilliQ-Wasser mit dem natürlichen Hormon E2, den synthetischen Hormonen EE2 und MeEE2, den Alkylphenolen OP und 4-n-NP, sowie BPA aufdotiert. Dazu wurde eine Stammlösung auf Methanolbasis hergestellt, wovon eine Teilmenge in eine 1 L-Borosilikatflasche gegeben wurde. Das Methanol wurde abgedampft und die Substanzen in der entsprechenden Menge MilliQ-Wasser gelöst.

Diese Probe wurde anschließend mit Hilfe der oben beschriebenen Säulenmaterialien (n=3) zehnfach aufkonzentriert. Durch die parallele Messung einer Originalprobe konnten die Wiederfindungsraten berechnet werden.

In Abb. 19 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Man kann erkennen, dass die Anreicherung für die gewählten Säulenmaterialien ähnlich gut ausfällt. Lediglich die Substanzen MeEE2 und 4-n-NP haben eine Wiederfindungsrate von unter 40%. Ursache hierfür kann eine schlechtere Effizienz für besonders hydrophobe Substanzen sein.

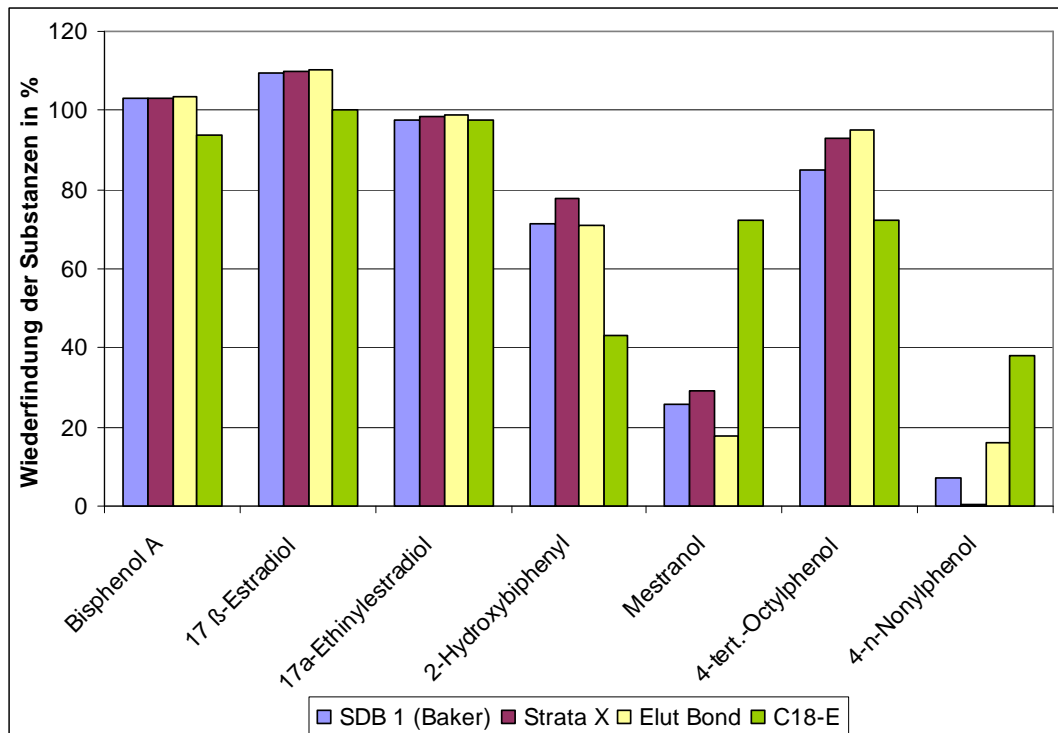


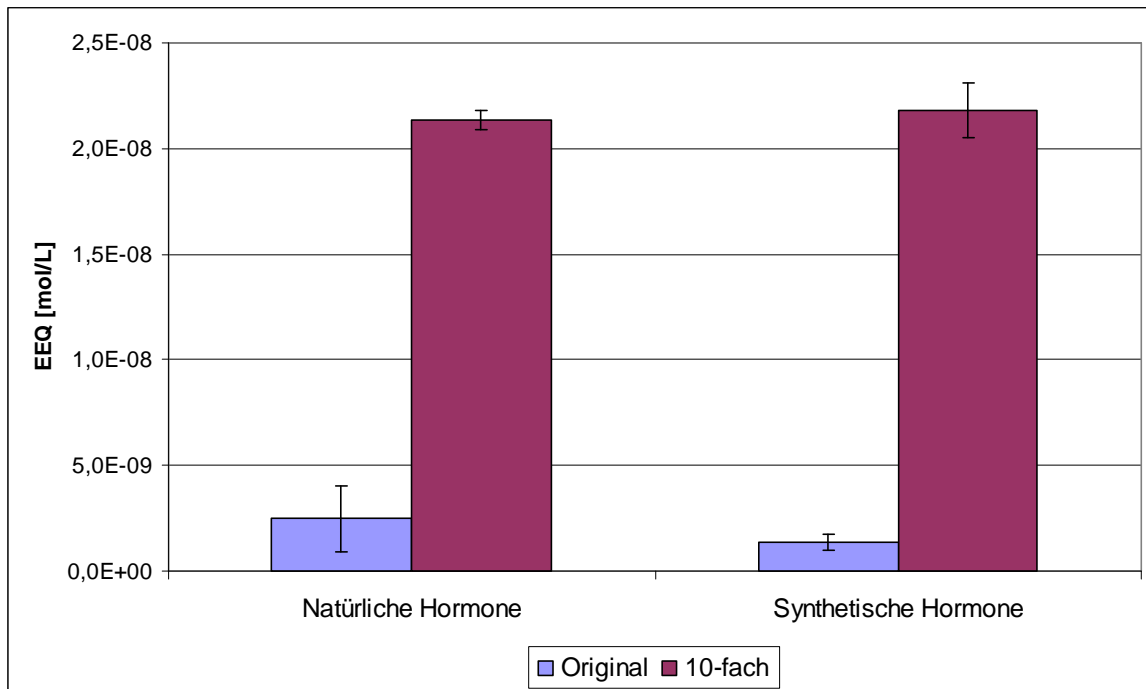
Abb. 19: Wiederfindungsraten nach der Aufkonzentrierung ausgewählter Substanzen mit verschiedenen Säulenmaterialien

### 6.3. EEQ Bestimmung von aufdotierten Proben

Nach den ersten Tests wurde SDB-1 als Festphasenmaterial festgelegt, da die Unterschiede der Materialien gering waren, und diese Festphase auch in der chemischen Analytik eingesetzt wird. In einem zweiten Schritt wurde die Wiederfindung mittels EEQ-Bestimmung im L-YES-Assay überprüft. Es wurden zwei Gemische von natürlichen bzw. synthetischen Hormonen aufkonzentriert und mittels L-YES-Assay getestet (n=3).

Dazu wurde MilliQ-Wasser mit den natürlichen Hormonen E2, E3 und E1 bzw. mit den synthetischen Hormonen EE2 und MeEE2 aufdotiert. Unter Verwendung einer Stammlösung auf Methanolbasis wurde eine berechnete Menge der Substanzen in eine 1 L-Borosilikatflasche gegeben, das Methanol abgedampft und die Substanzen mit der entsprechenden Menge MilliQ-Wasser gelöst.

In Abb. 20 wird jeweils der gemessene EEQ in mol/L der Originalprobe mit dem der aufkonzentrierten Probe verglichen. Man erhält eine plausible Wiederfindung der Hormone.



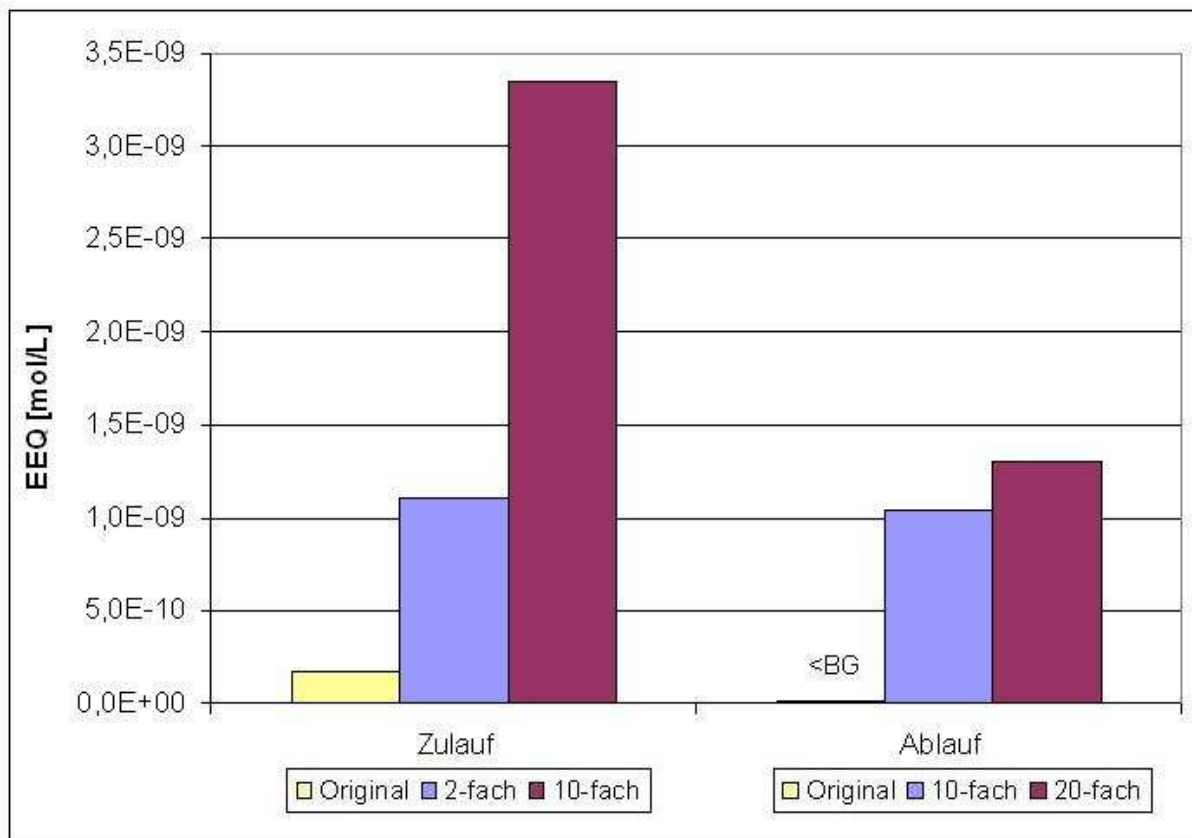
**Abb. 20:** Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung ausgewählter Substanzen mit der SDB-1 Säule

#### 6.4. EEQ-Bestimmung von Proben aus der Kläranlage

In einem weiteren Schritt wurden Proben aus Zu- bzw. Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, sowie einer weiteren Kläranlage in Süddeutschland aufkonzentriert und im L-YES-Assay gemessen.

In Abb. 21 sind die Ergebnisse der Proben aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut dargestellt. Der Zulauf wurde 2-fach bzw. 10-fach aufkonzentriert und der Ablauf wurde 10-fach bzw. 20-fach aufkonzentriert. Alle Proben wurden im Vergleich zur Originalprobe im L-YES-Assay gemessen. Der Versuch zeigt, dass eine 2-fache Aufkonzentrierung (Faktor 2) der Proben des Zulaufs (44,7 ng/L) eine 6,7-fache Wiederfindung (300,2 ng/L) und eine 10-fache Aufkonzentrierung (Faktor 10) eine 20,4-fache Wiederfindung (910,9 ng/L) ergibt.

Die Originalprobe des Ablaufs lag bereits unter der BG, weshalb keine Wiederfindungsraten errechnet werden konnten. Durch die 10-fache bzw. 20-fache Anreicherung konnte die BG gesenkt und eine EEQ für die Proben des Ablaufs bestimmen werden (285,9 ng/L bzw. 353,4 ng/L).



**Abb. 21: Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung von Zulauf und Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut**

In Abb. 22 sind die Ergebnisse der Aufkonzentrierung der Proben aus einer weiteren süddeutschen Kläranlage dargestellt. Der Zulauf wurde 5-fach bzw. 20-fach aufkonzentriert und der Ablauf wurde 10-fach bzw. 40-fach aufkonzentriert. Alle Proben wurden im Vergleich zur Originalprobe im L-YES-Assay gemessen. Der Versuch zeigt, dass eine 5-fache Aufkonzentrierung (Faktor 5) der Proben des Zulaufs (31,0 ng/L) eine 14,5-fache Wiederfindung (450,5 ng/L) und eine 20-fache Aufkonzentrierung (Faktor 20) eine 42,4-fache Wiederfindung (1315,4 ng/L) ergibt.

Die Originalprobe des Ablaufs lag bereits unter der BG, deshalb konnten keine Wiederfindungsraten berechnet werden. Durch die 10-fache bzw. 40-fache Anreicherung konnte die BG gesenkt werden, so dass ein EEQ für die Probe aus dem Ablaufs ermittelt werden konnte (233,7 ng/L bzw. 44,2 ng/L).

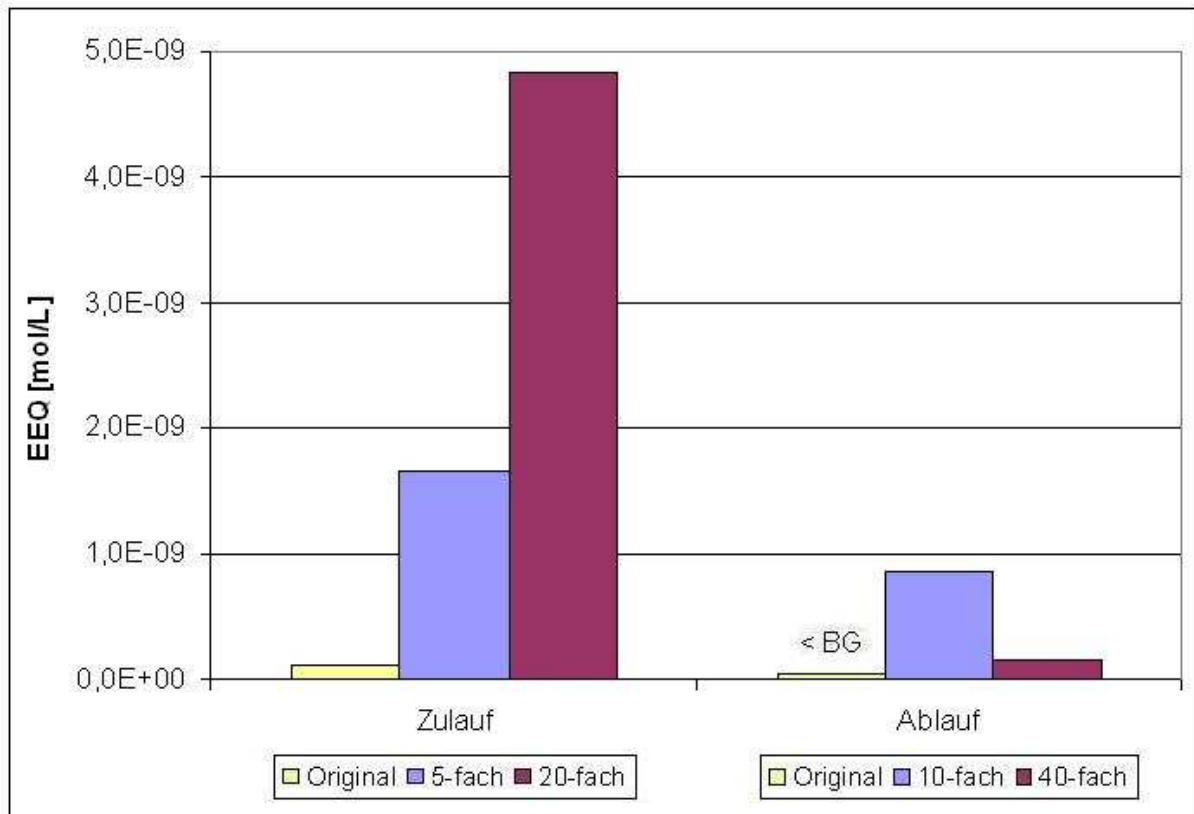
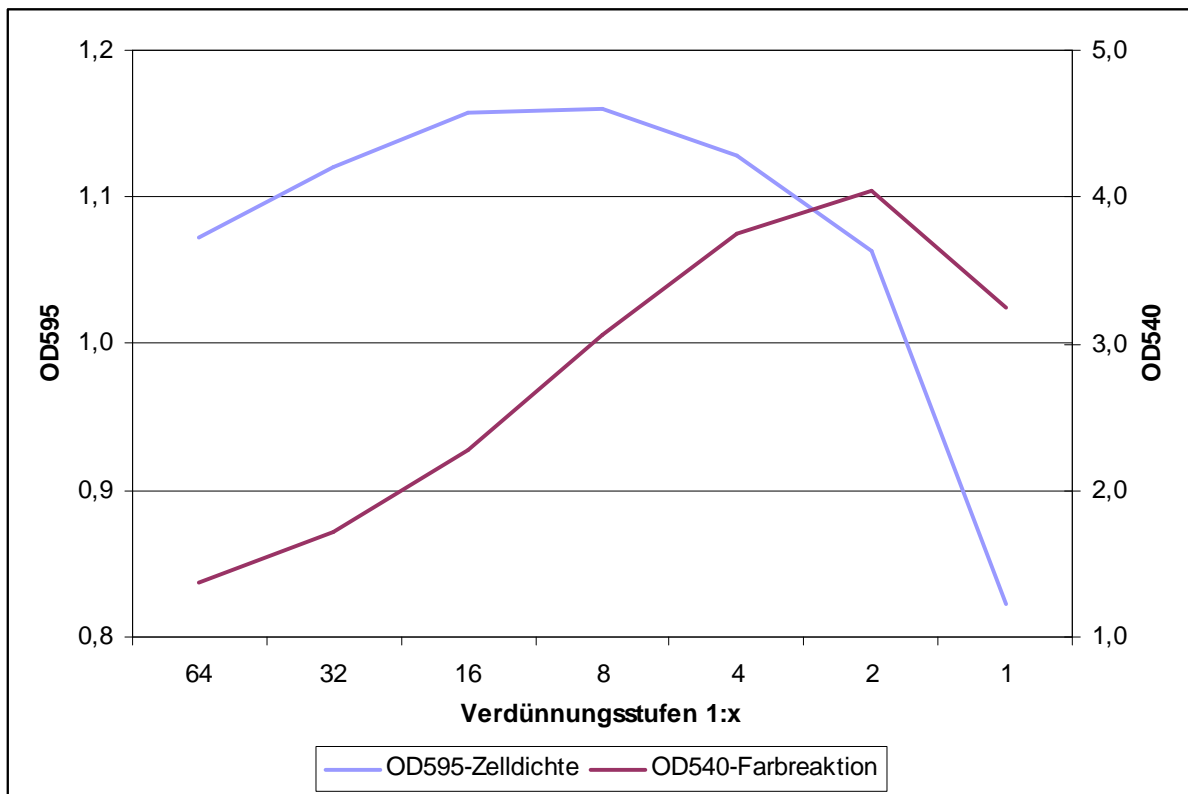


Abb. 22: Messwerte im YES-Assay vor und nach der Aufkonzentrierung von Zulauf und Ablauf einer süddeutschen Kläranlage

## 6.5. Diskussion

Bei der Messung der angereicherten Kläranlagenproben zeigten sich teilweise toxische Effekte während des L-YES-Assays (siehe Abb. 23). Dies äußerte sich in der Hemmung des Wachstums der Hefezellen (OD595) bei den am höchsten getesteten Konzentrationen. Je konzentrierter die Probe, desto höher sollte der Farbausschlag (OD540) einer estrogen aktiven Probe sein. Jedoch nehmen OD595 und OD540 bei den am höchsten getesteten Konzentrationen ab.



**Abb. 23: Zelldichte und Färbung der sieben getesteten Verdünnungsstufen der 20-fach aufkonzentrierten Probe eines Kläranlagenzulaufes**

Ausschlaggebend ist in diesem Fall wahrscheinlich die unspezifische Anreicherung von Substanzen in den Proben. Es werden nicht nur endokrine Disruptoren angereichert, sondern ebenfalls eine große Palette verschiedener Stoffe, die zum Teil toxische Wirkung auf das Hefewachstum aufweisen (s. Kapitel 4). Insgesamt wird deutlich, dass die Anreicherung von Umweltproben zur Messung im Bioassay problematisch sein kann.

Während der Versuche traten Probleme mit dem Blindwert auf. Tab. 17 zeigt, dass sowohl mit den auf polymerbasierten Kartuschen, als auch mit den kieselgelbasierten Kartuschen endokrine Aktivität in den Blindwerten auftrat. Es wurde zunächst geprüft, ob eine vorherige Aufreinigung des MilliQ-Wassers den Blindwert verbessern kann. Dazu wurde das MilliQ-Wasser mit Aktivkohle über Nacht geschüttelt, filtriert und dann für die Versuche verwendet. Im Ergebnis wurde nur eine leichte Verbesserung des Blindwertes durch die Aufreinigung des MilliQ-Wassers festgestellt. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob eine vorherige intensive Spülung der Säulen mit Acetonitril zu einer Verbesserung des Blindwertes führt. Dazu wurde vor dem Konditionieren der Säule bis zu sechsmal mit Acetonitril gespült, was ebenfalls eine leichte Verbesserung zur Folge hatte. Um festzustellen, ob die Stoffe sich im Wasser befinden oder sich endokrine Stoffe aus dem Material der Anreicherungskartuschen lösen, wurden sämtliche Anreicherungsschritte ohne Probenauftrag durchgeführt. Der

Befund liefert eine vergleichbar hohe EEQ. Das Herauslösen von Substanzen aus dem Kartuschenmaterial scheint die Ursache für erhöhte Blindwerte zu sein.

**Tab. 17: Blindwerte (EEQ in mol/L) nach der Aufkonzentrierung gemessen im L-YES-Assay**

	MilliQ	Aktivkohle- behandeltes MilliQ	Aktivkohle- behandeltes MilliQ und Vorspülen mit Acetonitril	alle Anreicherungs- schritte ohne Probenauftrag
<b>SDB-1</b>				
MW	6,06E-10	4,84E-10	2,20E-10	3,36E-10
STABW	1,50E-10	3,02E-10	9,90E-12	2,52E-10
<b>StrataX</b>				
MW	7,57E-10	6,10E-10	1,68E-10	2,54E-10
STABW	5,47E-10	3,41E-10	7,46E-11	1,40E-10
<b>StrataX-T</b>				
MW	-	1,91E-10	8,67E-11	4,11E-10
STABW	-	1,18E-10	3,58E-11	3,51E-10
<b>C18-E</b>				
MW	-	2,78E-10	-	-
STABW	-	4,91E-11	-	-

Alle Versuche zeigen, dass die Aufkonzentrierung von endokrinen Substanzen durch die SPE kritisch ist. Zum Teil zeigen die Werte nach Verrechnung mit dem Anreicherungsfaktor eine schlechte Übereinstimmung in der Wiederfindung. Die Wiederfindungsraten betragen teilweise über 300%, was durch eine assaybedingte STABW von 40% nicht mehr erklärbar ist. Es wird also mehr estrogene Substanz "wiedergefunden", als vor der Anreicherung in der Probe vorlag. Es zeigte sich, dass der Grund für die erhöhten Werte ein Herauslösen von endokrinen wirksamen Stoffen aus den Materialien der Anreicherungskartuschen ist.

In verschiedenen Publikationen wurden Methoden für die Anreicherung von estrogen aktiven Substanzen entwickelt und eingesetzt (s. Tab. 18).



**Tab. 18: Überblick zur Durchführung der Anreicherung estrogener Stoffe verschiedener Publikationen**

Quelle	SPE- Material	Proben	Kontrolle (EEQ)	Quantifizierung
Wagner et al., 2011a	C18 Oasis HLB SDB-1 SDB-XC Isolute ENV+ ENVI-Carb Plus	Mineralwasser	- Leitungswasser - Lösungsmittel - leere Kartusche (<BG)	E-Screen (BG=0,45 pg/L)
Pawlowski et al., 2003	RP-C18 (J.T. Baker)	Kläranlage Rheinproben	- Deionisiertes Wasser - Leitungswasser (<BG)	YES (BG=0,4 ng/L)
Aneck-Hahn et al., 2009	Chromabond C18	Trinkwasser	- Kontrollwasser= Renalcare® (<BG)	YES (BG=0,6-2,7 ng/L)
Jiang et al., 2012	Oasis HLB	Grundwasser	- Reinstwasser = procedural blank (k.A.)	YES (k.A.)
Krein et al., 2012	Oasis HLB	Oberflächenwasser, Abwasser	- procedural control - procedural extraction control, - Lösungsmittel (<BG).	YES (BG=0,06 ng/L)
Escher et al., 2008b	100 mg LiChrolut EN + 250 mg LiChrolut RP-C18 Empore SDB-RPS	Kläranlage Rheinproben	- Reinstwasser= procedural blank (<0,23 ng/L) - Lösungsmittel (<BG)	YES (BG= 0,02-0,1 ng/L)

Wagner et al. (2011a) untersuchten zusätzlich zu Mineralwasserproben alle verwendeten Lösungsmittel, sowie Extrakte aus Leitungswasser (Blindwerte) und Extrakte der leeren Kartuschen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikante estrogene Aktivität der Kontrollen im E-Screen. Für Flaschenwasser konnten EEQ von 1,9-12,2 pg/L ermittelt werden, wobei die Proben aus Plastikflaschen signifikant höhere Ergebnisse lieferten als Proben aus Glasflaschen. Wagner et al. (2011a) konnten ihre BG durch die Anreicherung von 33,6 auf 0,45 pg/L senken. In einer anderen Publikation von Wagner et al. (2011b) wurde das Problem estrogen kontaminierter Reinstwässer erwähnt, dass sich nicht beheben ließ. Die Messwerte im YES-Assay in Wagner et al. (2009) wurden um die Messwerte der Negativkontrolle ( $1,28 \pm 0,18$  ng/L EEQ) korrigiert.

Die Zusammenstellung der Literatur zeigt, dass alle Quellen ähnliche Materialien für die Anreicherung verwenden. Es handelt sich dabei generell um eher unpolare reversed Phasen. Die Unterschiede in der Methodik beziehen sich auf die Lösungsmittelwahl und die Lösungsmittelmenge, sowie pH-Wert der Waschlösung. Die Auswahl der Lösungsmittel reicht von Methanol über Hexan bis hin zu Aceton. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass bei der Anreicherung zum einen sehr viel Aufwand zur Absicherung der

Blindwerte getroffen werden muss, und zum anderen der geeignete Aufkonzentrierungsfaktor für jede Matrix (wie Abwasser, Oberflächenwasser oder Trinkwasser) zu ermitteln ist.

## 7. Analyse von Oberflächenwasser, Uferfiltrat und Grundwasser

Im Rahmen dieser Studie wurden Proben aus einer Uferfiltration und aus Oberflächengewässern sowie Trinkwasser analysiert. Die Proben wurden mit Hilfe der Einzelstoffanalytik (GC-MS) und des YES-Assays untersucht. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

Zunächst wurden orientierende Messungen mittels YES-Assay durchgeführt. Die EEQ des Trinkwassers, der Proben aus Rhein und Donau, sowie der Probe aus der Uferfiltration wurde dreimal im L-YES-Assay gemessen und liegen für alle unter der BG von 11,5 ng/L (siehe Tab. 19)

**Tab. 19: YES-Ergebnisse verschiedener Wasserproben**

Probenahmestelle	EEQ in ng/L
Trinkwasserprobe	<11,5
Rhein bei Düsseldorf	<11,5
Rhein bei Karlsruhe	<11,5
Donau bei Ulm	<11,5
Uferfiltrat bei Dortmund	<11,5

In nachfolgenden Versuchen wurden die Messungen im YES-Assay zusätzlich mit der chemischen Analytik verglichen. Es wurden Hormone und Alkylphenole, sowie BPA quantifiziert. In der Probe aus der Uferfiltration wurden BPA und OP mit 26.000 ng/L und 36 ng/L nachgewiesen. Mit dem L-YES-Assay konnte keine estrogene Aktivität erfasst werden.

In weiteren Oberflächenwasserproben wurde BPA in quantifizierbarer Konzentration nachgewiesen (5-28 ng/L). Untersuchungen mit dem L-YES-Assay zeigten keine estrogene Aktivität in allen 20 getesteten Proben (siehe Tab. 20).

**Tab. 20: Ergebnisse der Oberflächengewässern aus dem YES-Assay und der chemischen Analytik**

Probenahmestelle	Parameter	Ergebnis GC-MS in ng/L	EEQ <sub>berechnet</sub> in ng/L	EEQ <sub>gemessen</sub> in ng/L
Uferfiltrat bei Dortmund	BPA	26000	1,8	
	OP	36	0,0002	
	<i>Summe</i>		1,8	<11,5
Oberflächenwasser 1	BPA	21	0,0014	
	<i>Summe</i>		0,0014	<11,5
Oberflächenwasser 2	BPA	14	0,0010	
	<i>Summe</i>		0,0010	<11,5
Oberflächenwasser 3	BPA	7	0,0005	
	<i>Summe</i>		0,0005	<11,5
Oberflächenwasser 4	BPA	9	0,0006	
	<i>Summe</i>		0,0006	<11,5
Oberflächenwasser 5	BPA	19	0,0013	
	<i>Summe</i>		0,0013	<11,5
Oberflächenwasser 6	BPA	6	0,0004	
	<i>Summe</i>		0,0004	<11,5
Oberflächenwasser 7	BPA	14	0,0010	
	<i>Summe</i>		0,0010	<11,5
Oberflächenwasser 8	BPA	18	0,0012	
	<i>Summe</i>		0,0012	<11,5
Oberflächenwasser 9	BPA	7	0,0005	
	<i>Summe</i>		0,0005	<11,5
Oberflächenwasser 10	BPA	16	0,0011	
	<i>Summe</i>		0,0011	<11,5
Oberflächenwasser 11	BPA	16	0,0011	
	<i>Summe</i>		0,0011	<11,5
Oberflächenwasser 12	BPA	16	0,0011	
	<i>Summe</i>		0,0011	<11,5
Oberflächenwasser 13	BPA	13	0,0009	
	<i>Summe</i>		0,0009	<11,5
Oberflächenwasser 14	BPA	7	0,0005	
	<i>Summe</i>		0,0005	<11,5
Oberflächenwasser 15	BPA	14	0,0010	
	<i>Summe</i>		0,0010	<11,5
Oberflächenwasser 16	BPA	22	0,0015	
	<i>Summe</i>		0,0015	<11,5
Oberflächenwasser 17	BPA	9	0,0006	
	<i>Summe</i>		0,0006	<11,5
Oberflächenwasser 18	BPA	5	0,0003	
	<i>Summe</i>		0,0003	<11,5
Oberflächenwasser 19	BPA	28	0,0019	
	<i>Summe</i>		0,0019	<11,5
Oberflächenwasser 20	BPA	24	0,0016	
	<i>Summe</i>		0,0016	<11,5

Bei Pawlowski et al. (2004) wurden zwei verschiedenen Proben aus dem Rhein im L-YES untersucht. Es wurden EEQ<sub>gemessen</sub> von 11,97 ng/L bzw. 19,42 ng/L bestimmt, sowie eine

EEQ<sub>berechnet</sub> von 3,4 ng/L aus Messwerten von bekannten Estrogenen und Phytoestrogenen ermittelt. Escher et al. (2008b) haben eine EEQ<sub>gemessen</sub> von ca. 0,67 ng/L in einem Oberflächengewässer in der Schweiz bestimmt. Krein et al. (2012) untersuchten innerhalb eines Jahres verschiedene Oberflächengewässer in Luxemburg. Sie ermittelten dabei Konzentrationen bis zu 20,77 ng/L. Zusätzlich stellten sie fest, dass es zu einem Anstieg der estrogenen Aktivität im Sommer kommt, der parallel mit einem Anstieg von E1 einhergeht.

## 8. Biologischer Abbau unter definierten Randbedingungen

Sowohl in Kläranlagen als auch in Oberflächengewässern und bei der Uferfiltration werden die Abbauprozesse von den unterschiedlichen Abbaubedingungen beeinflusst. Als Elektronenakzeptoren werden Sauerstoff, Nitrat und Carbonat (Kläranlage) oder Sauerstoff, Nitrat, Eisen(III) und evtl. Sulfat (Uferfiltration) genutzt. Es wurde daher geprüft, unter welchen Randbedingungen der Abbau der endokrinen Substanzen besonders effektiv ist.

Es wurden Mikrokosmen-Abbauversuche zu BPA, 2-HBP und ausgewählten natürlichen Hormonen und synthetischen Hormonen durchgeführt. Solche Abbauversuche bieten die Möglichkeit, die mikrobiellen Prozesse in einem kontrollierbaren, geschlossenen System zu beurteilen. Man erhält dabei Informationen über die abbaubaren endokrinen Stoffe sowie eventuell auftretende Abbauprodukte. Die Tab. 21 beinhaltet eine Übersicht über die verschiedenen Abbauversuche.

**Tab. 21: Übersicht Abbauversuche**

	Xenohormone		Natürliche Hormone	Synthetische Hormone
	20 mg/L BPA	200 mg/L 2-HBP	je 50 µg/L E1, E2 und E3	je 50 µg/L EE2 und MeEE2
<b>Aerob</b>	X	X	X	X
<b>Anaerob</b>				
Nitrat	X	X	X	X
Eisen			X	X
Sulfat			X	X
<b>Inokulum</b>	mit Medium und 2% frischen Belebtschlamm		mit Proben aus einer Uferfiltration bei Dortmund	

Die Abbauversuche zu den Xenohormonen wurden als Einzeluntersuchungen in Mineralmedium mit Belebtschlamm angesetzt. Die Konzentrationen betragen 20 mg/L für BPA und 200 mg/L für 2-HBP. Die Versuche wurden jeweils unter aeroben und anaeroben (Nitrat-reduzierenden) Bedingungen durchgeführt.

Die Abbauprobungen zu den Hormonen wurden mit Mischungen mehrerer Substanzen in Uferfiltrat angesetzt. Die erste Mischung bestand aus den natürlichen Hormonen E1, E2 und E3 und die zweite aus den synthetischen Hormonen EE2 und MeEE2, wobei die Konzentrationen für alle Substanzen bei 50 µg/L lagen. Die Versuche wurden jeweils unter aeroben und anaeroben (Nitrat-, Eisen(III)- und Sulfat-reduzierend) Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Mischung aus allen Hormonen bei 4 °C gelagert und als Kontrolle mitgeführt.

## 8.1. Bisphenol A

In Abb. 24 sind die Ergebnisse der Abbauprobungen von BPA unter aeroben Bedingungen dargestellt. Die chemische Analytik ergab, dass BPA bereits nach drei Tagen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Parallel nimmt die EEQ, d.h. die estrogenen Aktivität, und der DOC ab. Zusätzlich wurden zwei Peaks (RT: 10,8 und 11,9 Minuten) mittels HPLC-Analytik nachgewiesen, die gleichzeitig mit dem Abbau von BPA entstanden und erst später abgebaut wurden. Auch nachdem BPA abgebaut war, konnte immer noch eine estrogen Wirkung gemessen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die entstandenen Transformationsprodukte estrogen wirksam sind.

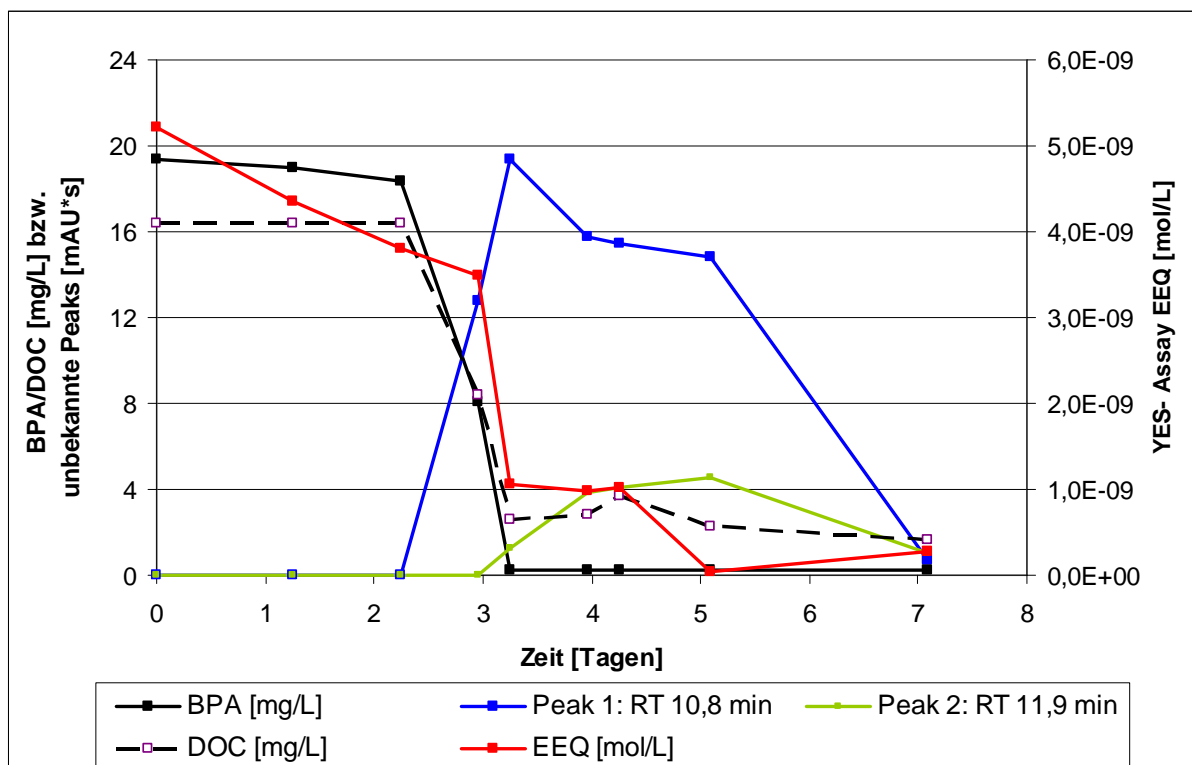
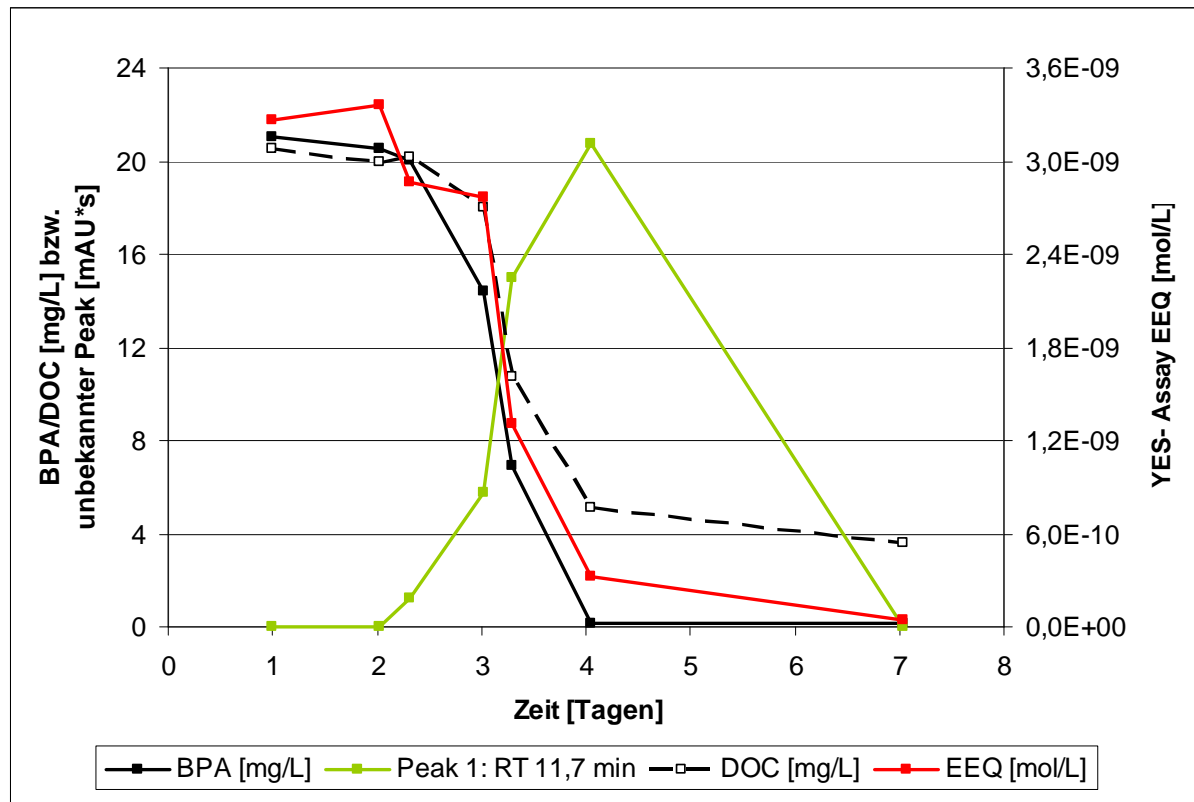


Abb. 24: Aerober Abbau für BPA

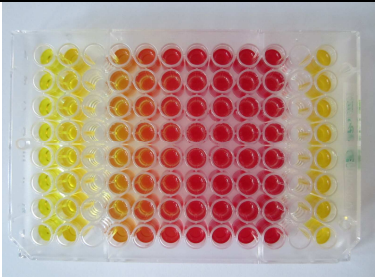
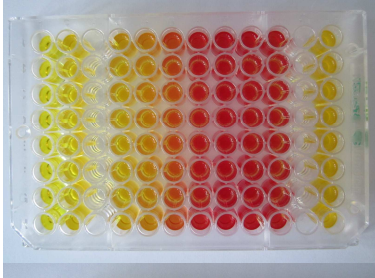
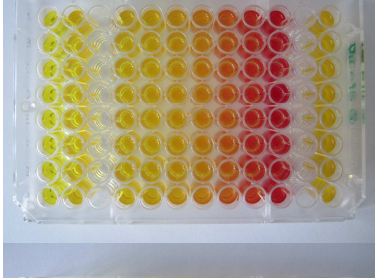
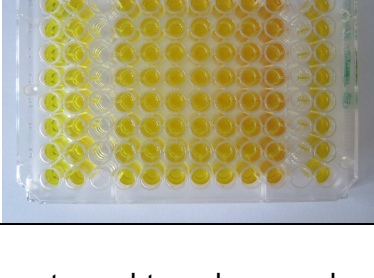
Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden Versuche unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt. In diesem Versuch konnte ebenfalls die Entstehung eines Transformationsproduktes (siehe Abb. 25; Peak 1: RT 11,7 min) nachgewiesen werden. Auch hier wurde eine estrogene Wirkung nach dem Abbau von BPA gemessen. Dies lässt den Schluss zu, dass Transformationsprodukte estrogen wirksam sind.



**Abb. 25: Aerober Abbau für BPA**

Die Ergebnisse des L-YES-Assays und der Analytik sind in Tab. 22 illustriert. Die Proben wurden jeweils unverdünnt in den Test eingesetzt. Man kann eine deutliche Abnahme der Färbung erkennen. Je geringer die Färbung, desto geringer ist die estrogene Aktivität im L-YES.

**Tab. 22: Vergleich L-YES-Assay und chemische Analytik beim aeroben BPA-Abbau**

Zeit in Tagen	Messung	BPA in mg/L	EEQ <sub>gemessen</sub> in mol/L
2,0		20,5	3,4E-09
3,3		6,9	1,3E-09
4,0		< 0,1	3,3E-10
7,0		< 0,1	<4,2E-11

Ike et al. (2000) untersuchten den aeroben Abbau von BPA in drei Mikrokosmen mit Belebtschlamm und 44 Mikrokosmen mit Oberflächenwasser. Die meisten der Ansätze hatten das Potential zum Abbau von BPA. Eine vollständige Mineralisation fand jedoch nur in sechs Mikrokosmen mit Oberflächenwasser statt. Bei den anderen Ansätzen konnte eine Akkumulation der zwei Metabolite 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-1,2-propandiol und p-Hydroxyphenacylalkohol beobachtet werden. Es fand jedoch keine Untersuchung dieser Metabolite auf estrogene Aktivität statt.

Die Inkubation von BPA mit Belebtschlamm unter anaeroben Nitrat-reduzierenden Bedingungen zeigte konstante Werte aller gemessenen Parameter innerhalb von 103 Tagen. Parallel zeigte der DOC konstante Werte. Auch die gemessenen Werte im L-YES-Assay

zeigten keine Abnahme der estrogenen Aktivität. Voordeckers et al. (2002) konnten unter methanogenen, Sulfat- und Nitrat-reduzierenden Bedingungen ebenfalls keinen Abbau von BPA nach 162 Tagen feststellen und folgerten, dass sich BPA in anaeroben Umweltkompartimenten akkumuliert.

## 8.2. 2-Hydroxybiphenyl

In Abb. 26 ist der Abbau von 2-HBP unter aeroben Bedingungen mit Belebtschlamm dargestellt. Die Substanz 2-HBP war bereits nach vier Tagen mittels HPLC-Analytik nicht mehr nachweisbar. Parallel findet eine Abnahme der EEQ, d.h. der estrogenen Aktivität, und des gelösten organischen Kohlenstoffes statt. Zusätzlich wurde ein Peak (RT 3,3 min) detektiert, der gleichzeitig mit dem Abbau von 2-HBP entsteht und am Ende des Versuches ebenfalls abnimmt (nach 7 Tagen). Die Ergebnisse der estrogenen Aktivität zeigen jedoch, dass temporäre Transformationsprodukte keine Estrogenität besitzen.

Eine rasche Umsetzung von 2-HBP beobachteten auch Gonsior et al. (1984). In dieser Publikation wurde eine Abnahme von 50-65 % des 2-HBP innerhalb 16 Tagen in Oberflächenwasser bzw. innerhalb von 48 h in Belebtschlamm nachgewiesen.

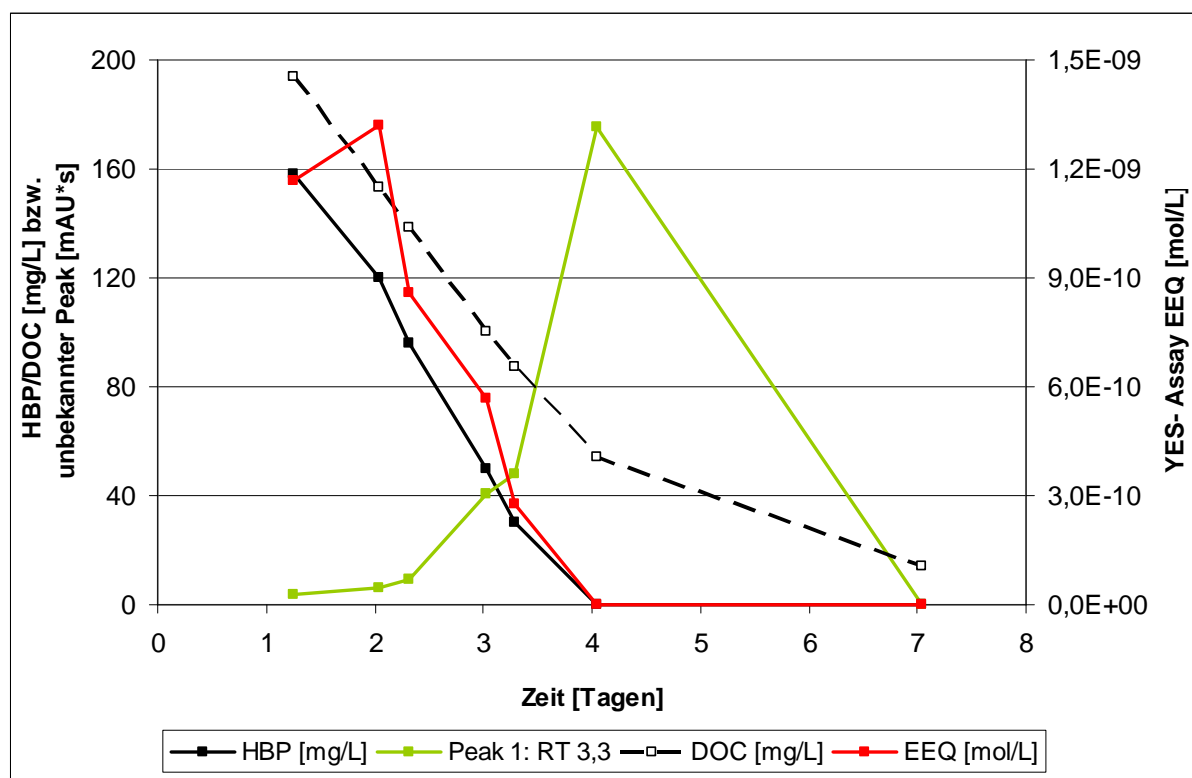


Abb. 26: Aerober Abbau für 2-Hydroxybiphenyl



Der Abbau von 2-HBP mit Belebtschlamm unter anaeroben Nitrat-reduzierenden Bedingungen zeigte konstante Werte aller gemessener Parameter innerhalb von 103 Tagen. Es konnte keine Abnahme der estrogenen Wirkung im L-YES-Assay beobachtet werden. Die Auswertung des HPLC-Chromatogramms zeigte zu diesem Zeitpunkt keinerlei unkalibrierte Peaks.

### 8.3. Natürliche Hormone (E1, E2 und E3)

In Mikrokosmen unter aeroben Bedingungen wurde ein schneller Abbau der natürlichen Hormone E1, E2 und E3 beobachtet (siehe Abb. 27). Die Konzentrationen von E2 und E3 lagen nach 127 Tagen unter der BG der chemischen Analytik (GC-MS) von jeweils 0,1 µg/L. Lediglich E1 lag knapp über der BG bei 110 ng/L. Die Konzentration von E1 stieg während des Versuchszeitraums kurzfristig an. Der kurzfristige Anstieg lässt sich durch die Oxidation von E2 zu E1 erklären. Bereits Ternes et al. (1999b) beobachteten eine Oxidation von E2 zu E1 unter aeroben Bedingungen. Andere Quellen bestätigen den raschen Abbau von E2 über die Oxidation zu E1 (Liu et al., 2011; Czajka et al., 2006; Schmidt et al., 2012).

Der Abbau der Substanzen (BG < 100 ng/L) hat zudem eine Abnahme der estrogenen Aktivität zur Folge. Die Werte des L-YES-Assays lagen nach 212 Tagen unter der BG von 11,5 ng/L EEQ bzw. 4,2E-11 mol/L EEQ.

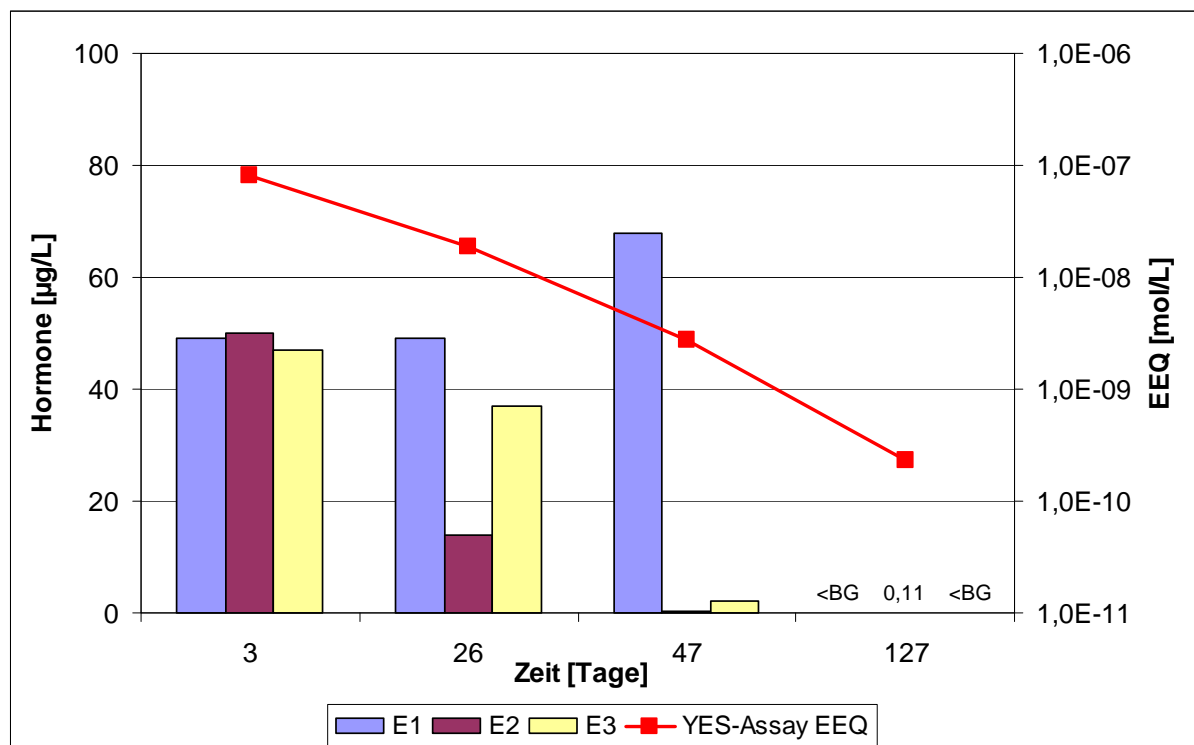


Abb. 27: Abbau der natürlichen Hormone unter aeroben Bedingungen (BG = 0,1 µg/L)

In Abb. 28 sind die Ergebnisse zu den anaeroben Abbauprobungen der natürlichen Hormone E1, E2 und E3 unter verschiedenen Redoxbedingungen dargestellt. Generell kann man einen geringen Abbau von E2 unter Sulfat- und Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen beobachten. Lediglich unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen konnte ein vollständiger Abbau aller Substanzen erzielt werden (< BG von 0,1 µg/L).

Die Substanz E2 wurde unter Sulfat- und Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen etwa zur Hälfte abgebaut. Die Hormone E3 und E1 steigen leicht an. Dieser Anstieg ist das Resultat des E2-Abbaus, welcher sowohl unter aeroben Bedingungen (Ternes et al., 1999b), als auch unter anaeroben Redoxbedingungen (methanogen, Sulfat-, Eisen-, Nitrat-reduzierend) beschrieben wurde (Czajka et al., 2006). Czajka et al (2006) untersuchten die entstehenden Transformationsprodukte beim E2-Abbau. Hierzu zählen u.a. E1, aber auch E3 und 17α-Estradiol.

Auch Schmidt et al. (2012) beschrieben einen Abbau von E2 und dessen Transformation zu E1. Das Hormon E1 steigt dabei in seiner Konzentration an, ist aber letztendlich unter aeroben und Nitrat-reduzierenden Bedingungen gut abbaubar (Schmidt et al., 2012; Czajka et al., 2006). E1 wird unter Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen schlecht abgebaut, was auch Ivanov et al. (2010) (27% Abbau) beobachteten. Lediglich unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen wurde ein vollständiger Abbau beobachtet (Schmidt et al., 2012).

Schmidt et al. (2012) stellten fest, dass E3 ebenfalls ein Metabolit von E2 und E1 sein kann. Ivanov et al. (2010) beobachteten einen Abbau von 60 % innerhalb von 15 Tagen unter Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen.

In diesen Versuchen stimmte die chemische Analytik mit den Befunden im L-YES-Assay weitgehend überein. Unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen verringerte sich die estrogenische Wirkung deutlich.

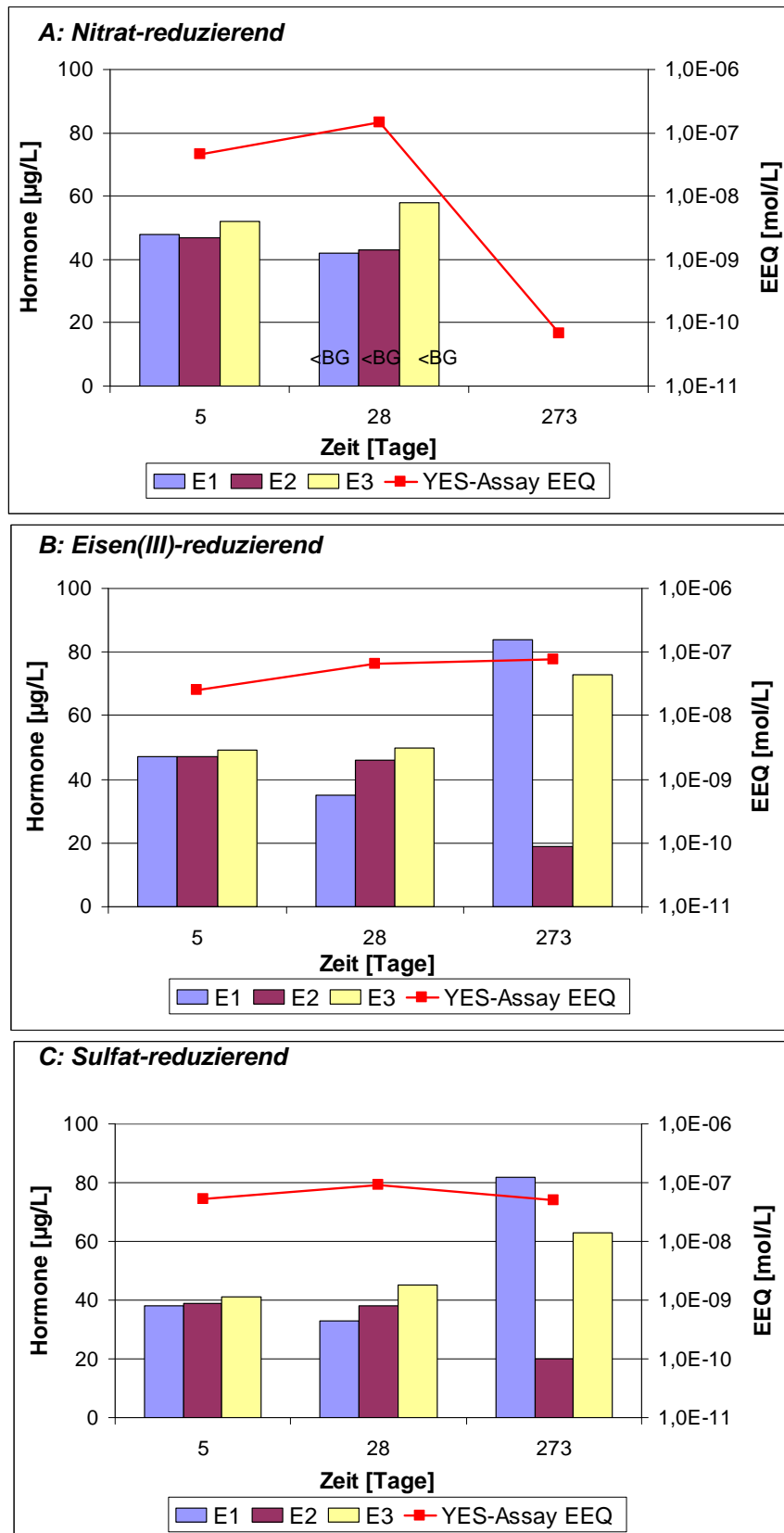


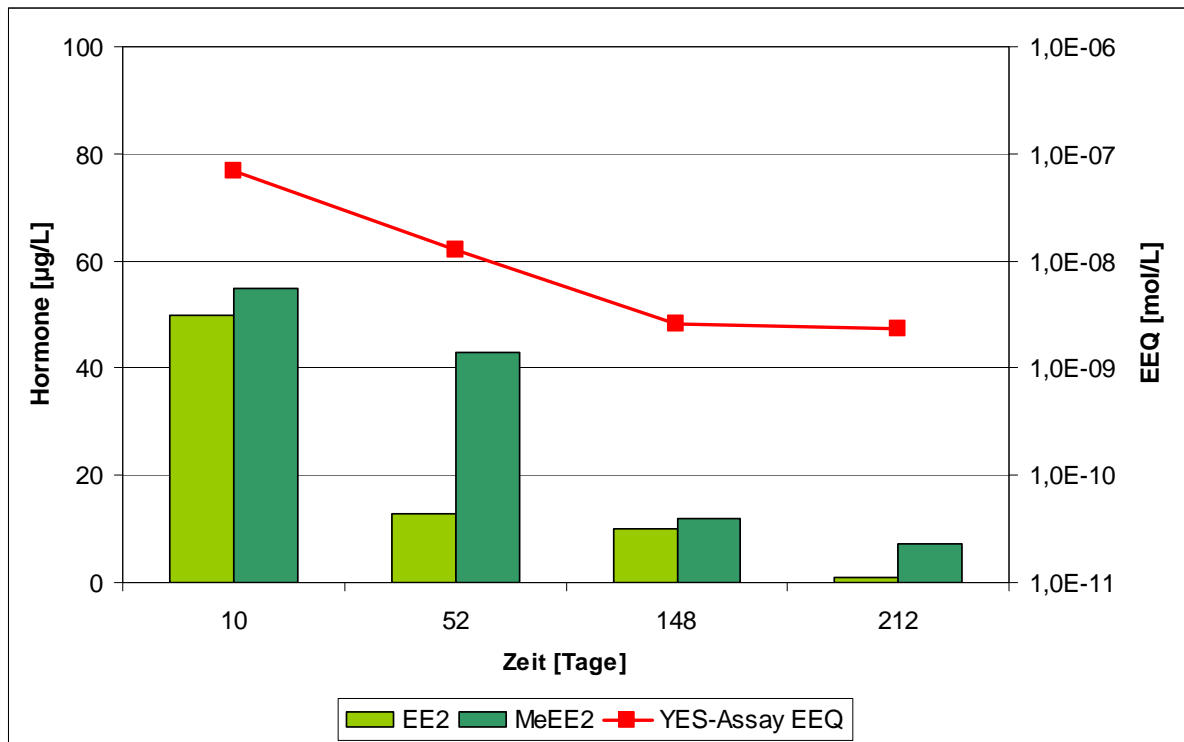
Abb. 28: Abbau der natürlichen Hormone unter verschiedenen Redoxbedingungen

#### 8.4. Synthetische Hormone (EE2 und MeEE2)

Die Mikrokosmenversuche unter aeroben Bedingungen zeigten einen – gegenüber den natürlichen Hormonen – verzögerten Abbau der synthetischen Hormone EE2 und MeEE2 (siehe Abb. 29). Beide Substanzen waren nach 212 Tagen bis zu 85 % abgebaut, wobei der Abbau von MeEE2 langsamer ablief.

In der Literatur ist beschrieben, dass das Hormon EE2 unter aeroben Bedingungen mit Belebtschlamm persistent ist und MeEE2, mit Bildung geringer Mengen an EE2, durch Demethylierung relativ rasch abgebaut wird (Ternes et al., 1999b). Es muss berücksichtigt werden, dass bei Ternes et al. (1999b) 20 % Belebtschlamm eingesetzt wurden und die Beprobung nur innerhalb von drei Tagen stattgefunden hat. Bei den in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen konnte an Tag 3 ebenfalls kein Abbau nachgewiesen werden. Erst nach 47 Tagen konnte eine Abnahme der EE2-Konzentration beobachtet werden, diese sank im weiteren Versuchsverlauf auf eine Konzentration von 1 µg/L ab (siehe Abb. 29).

Der Abbau der Substanzen hatte eine Abnahme der estrogenen Aktivität zur Folge. Die Werte des L-YES-Assays lagen nach 212 Tagen bei 2,4E-09 mol/L. Dieser Wert zeigt eine gute Übereinstimmung mit der  $EEQ_{\text{berechnet}}$  von 3,1E-09 mol/L der chemischen Analytik. Anschließend wurden noch weitere Messungen mittels YES-Assay unternommen, wobei die EEQ nach 303 Tagen 1,1E-09 mol/L und nach 363 Tagen 7,3E-10 mol/L betrug (siehe Abb. 29). Der Vergleich der berechneten und gemessenen EEQ lieferte für diese Substanzen keinen Hinweis auf die Bildung estrogenen Metabolite.



**Abb. 29: Abbau der synthetischen Hormone unter aeroben Bedingungen**

In Abb. 30 sind die Ergebnisse zu den anaeroben Abbaubersuchen der synthetischen Hormone EE2 und MeEE2 unter verschiedenen Redoxbedingungen dargestellt. Diese liefern sehr unterschiedliche Ergebnisse. Das Hormon MeEE2 wurde nur unter Sulfat- und Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen abgebaut. Keines der beiden Hormone wurde unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen abgebaut. Das Hormon EE2 stieg unter Sulfat- und Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen an.

Eine teilweise oder vollständige Demethylierung von MeEE2, könnte den Anstieg von EE2 erklären. Bei einer vollständiger Umsetzung des eingesetzten MeEE2 (~ 50 µg/L) zu EE2 ergibt sich eine theoretische Konzentration von 48 µg/L EE2. Dies entspricht einem Anstieg auf eine EE2-Konzentration von ~97 µg/L EE2. Verglichen mit den zwei gemessenen Konzentrationen von 96 µg/L EE2 (Eisen(III)-reduzierend) und 78 µg/L EE2 (Sulfat-reduzierend) zeigt dies, dass zumindest in den Eisen(III)-reduzierenden Ansätzen die theoretischen Werte den tatsächlich gemessenen Werten entsprechen. Aus diesem Grunde ist von einer nahezu vollständigen Umsetzung von MeEE2 zu EE2 auszugehen.

Auch andere Quellen beschreiben das synthetische Hormon EE2 als persistent unter verschiedenen anaeroben Abbaubedingungen (Nitrat, Sulfat, Eisen(III), methanogen) (Schmidt et al., 2012; Czajka et al., 2006; Ivanov et al., 2010; Ternes et al., 1999a; Vader et al., 2000). Gehring et al. (2003) schrieben dem Hormon MeEE2, genau wie dem Hormon

EE2, eine schlechte Abbaubarkeit unter anaeroben Bedingungen zu, wobei unsere Daten eine Transformation unter Sulfat- und Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen.

Eine Abnahme der endokrinen Aktivität konnte in keinem der Ansätze ermittelt werden (s. Abb. 30). Da das Hormon EE2 eine höhere estrogene Aktivität besitzt als MeEE2 wurde zum Teil ein Anstieg der estrogenen Wirkung beobachtet.

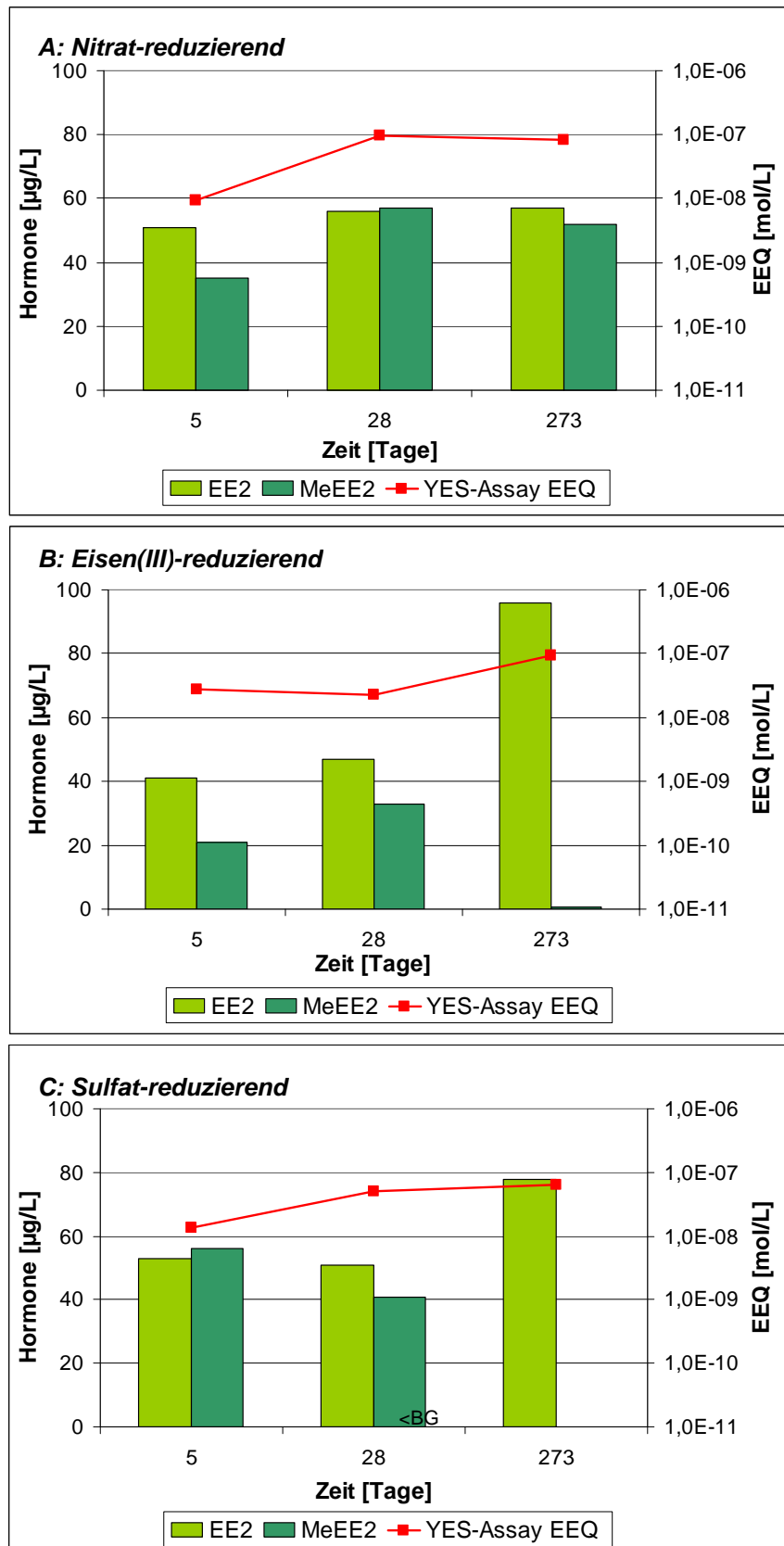


Abb. 30: Abbau der synthetischen Hormone unter verschiedenen Redoxbedingungen

## 8.5. Vergleich mit Literaturdaten

In einem Review wurde diskutiert, unter welchen Bedingungen endokrine Disruptoren in Mikrokosmen oder in synthetischen Medien metabolisiert werden. Dabei wurden neben unterschiedlichen Redoxbedingungen auch verschiedene Konzentrationsbereiche betrachtet (Combalbert, 2010). Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der Matrix, die Temperatur sowie die Biozönose eine entscheidende Rolle für die ermittelten Abbauraten diskutiert. Einen nicht systematisch auftretenden Effekt hat beispielsweise die Konzentration. Während Konzentrationen von 0,03 µg/L bis 10 µg/L keinen Einfluss zeigten, können Konzentrationen größer 100 µg/L einen negativen Einfluss auf die Abbauraten haben (Combalbert, 2010). Bei Versuchen mit Konzentrationen zwischen 0,5 mg/L und 50 mg/L zeigte sich ein gegenteiliges Bild: Mit steigender Estrogenkonzentration stieg die Abbauraten (Combalbert, 2010). In Experimenten mit Belebtschlamm unter aeroben Bedingungen konnten Halbwertszeiten für E1, E2 und E3 von wenigen Stunden ermittelt werden. Für EE2 sowie BPA beträgt die Halbwertszeit etwa einen Tag (Combalbert, 2010; Ike et al., 2000; Ivanov et al., 2010; Ternes et al., 1999; Xu, 2009). Unter Ausschluss von Sauerstoff werden deutlich höhere Halbwertszeiten angegeben. Für EE2 und BPA kann unter methanogenen sowie Eisen(III)- und Sulfat-reduzierenden Bedingungen selbst nach 35 Monaten bzw. 5 Monaten kein Abbau festgestellt werden (Combalbert, 2010; Voordeckers, 2002). Unter anaeroben Laborbedingungen mit Sulfit als dominantem Elektronenakzeptor in Grundwasser konnten nach 70 Tagen nur eine geringe Abnahme der Konzentration von E2 bzw. EE2 beobachtet werden (Ying et al., 2003). E2 dagegen wird unter Eisen(III)-reduzierenden Bedingungen innerhalb von 15 Tagen fast vollständig abgebaut (Ivanov et al., 2010). Die genannten Veröffentlichungen bestätigen die hohe Relevanz der Redoxbedingungen auf den Abbau. Ein Abgleich der chemisch-analytischen Befunde mit der estrogenen Wirkung wurde in den Studien in der Regel nicht durchgeführt.

## 9. Vergleich des L-YES mit dem Leuchtbakterienhemmtest

Neben dem L-YES-Assay wurde der Leuchtbakterienhemmtest zur summarischen Ermittlung der akuten Toxizität im Rahmen dieser Studie angewandt. Für die Darstellung der Ergebnisse des Leuchtbakterienhemmtests wurde der G<sub>10</sub>-Wert genutzt. Dieser gibt die niedrigste getestete Verdünnungsstufe an, bei der die Hemmung der Biolumineszenz nach 30 min kleiner 20% war. Die niedrigste mögliche Verdünnungsstufe im Test ist 2, d.h. für eine Wasserprobe mit dem G<sub>10</sub>-Wert 2 wurde keine toxische Wirkung bestimmt (<BG). Je



höher der G1b-Wert, desto toxischer ist die Wasserprobe. Die Ergebnisse aus den beiden Biotest-Verfahren wurden miteinander verglichen. Hierzu wurden zum einen Proben aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und zum anderen Proben aus den aeroben Abbauprobungen untersucht.

Die Proben der Kläranlage Karlsruhe-Neureut wurden zusätzlich zur chemischen Analytik und vergleichend zum L-YES-Assay auf akute Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest getestet. Der G1b sowie der EEQ für Zulauf, Belebungs- und Ablauf sind in Tab. 23 aufgelistet.

**Tab. 23: Vergleichende Untersuchung von Proben aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut auf endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (G1b)**

Proben	EEQ in mol/L	G1b
Zulauf	70,3	4
Belebungs	< 11,5	16
Ablauf	< 11,5	<BG

Man kann sowohl eine Abnahme der estrogenen Aktivität als auch eine Abnahme der Toxizität durch die Behandlung in der Kläranlage erkennen. In Hinsicht auf die Toxizität sind die Messwerte der Wasserprobe aus der Belebungsphase auffällig.

Während des aeroben Abbaus der Xenohormone BPA und 2-HBP wurden ebenfalls vergleichende Messungen mittels YES- und Leuchtbakterienhemmtest durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 24 dargestellt.

**Tab. 24: Vergleichende Untersuchung von Proben aus den aeroben Abbauprobungen der Xenohormone hinsichtlich endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (G1b)**

BPA			2-HBP		
Zeit in Tagen	EEQ in mol/L	G1b	Zeit in Tagen	EEQ in mol/L	G1b
2,0	3,4E-09	16	1,3	1,3E-09	16
3,3	1,3E-09	8	2,3	8,6E-10	8
4,0	3,3E-10	<BG	4,0	<4,2E-11	<BG

Die ermittelten G1b-Werte nehmen über die Versuchsdauer ab, dies ist gleichbedeutend mit einer Abnahme der Toxizität. Ebenso nimmt die EEQ, d.h. die estrogene Aktivität der Probe ab. Beides geschieht parallel zum Abbau der Substanzen. Der getestete G1b der Startkonzentration von 2-HBP ist größer als der von BPA.

Auch innerhalb des aeroben Abbaus der Hormone wurden Proben im Leuchtbakterienhemmtest überprüft. Sowohl bei der Startbeobachtung als auch zu späteren Zeitpunkten konnte keinerlei Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest nachgewiesen werden

(siehe Tab. 25). Bei Startkonzentrationen von jeweils 50 µg/L entsprach dieses Ergebnis den Erwartungen.

**Tab. 25: Vergleichende Untersuchung von Proben aus den aeroben Abbaueversuchen der natürlichen und synthetischen Hormone hinsichtlich endokrine Aktivität (EEQ) und Toxizität (Glb)**

Natürliche Hormone			Synthetische Hormone		
Zeit in Tagen	EEQ in mol/L	Glb	Zeit in Tagen	EEQ in mol/L	Glb
3	8,0E-08	< BG	3	2,5E-08	< BG
18	2,2E-08	< BG	26	1,0E-08	< BG
52	1,8E-08	< BG	52	1,3E-08	< BG

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse, dass der Leuchtbakterienhemmtest und der YES-Assay wie erwartet zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen. Es handelt sich um zwei unterschiedliche Assays mit unterschiedlichen Endpunkten, wobei der eine die akute Toxizität einer Probe und der andere die estrogene Aktivität einer Probe erfasst. Entsprechend resultieren daraus unterschiedliche Verlaufskurven.

## 10. Elimination der estrogenen Wirkung in der Kläranlage

Zur Ermittlung der Eliminationsleistung von Kläranlagen hinsichtlich der estrogenen Aktivität wurden u.a. Proben aus der Kläranlage des Abwasserzweckverbandes Breisgauer Bucht untersucht. Der Zulauf dieser Kläranlage wird in einem Kanal gesammelt, über dessen Füllstand der Volumenstrom in die Anlage reguliert wird. Als erste mechanische Stufe wird die Rechenanlage passiert. Diese hält Stoffe, die größer als 5 mm bis 20 mm sind, zurück. Das Rechengut wird entwässert und entsorgt. In der zweiten mechanischen Stufe, dem Sandfang, werden Feststoffe mit einem Durchmesser größer 0,1 mm abgesetzt. Die häufig mineralischen Stoffe werden gewaschen und ebenfalls entsorgt. Als dritte und letzte mechanische Stufe folgt das Vorklärbecken mit kombiniertem Fettfang. Aufgrund der niedrigen Fließgeschwindigkeit sedimentieren noch vorhandene Feststoffe, während Fette aufschwimmen. Mittels entsprechenden Räumwerkzeugen wird der Feststoff in einen Trichter geschoben und das aufgeschwommene Fett abgetragen.

Der mechanischen folgt die biologische Reinigung, bei der zwischen der Denitrifikation und der Nitrifikation unterschieden wird. Während zur Oxidation von Ammonium zu Nitrat in der Nitrifikation Sauerstoff bzw. Umgebungsluft eingeblasen wird, führt das Fehlen von Sauerstoff zur Reduktion von Nitrat und Nitrit zu Stickstoff. In beiden Stufen kommt es zu einer Anreicherung von Biomasse bzw. Belebtschlamm. Dieser wird im Nachklärbecken abgesetzt, durch Räumwerkzeuge gesammelt und in einem Trichter verdichtet.

Für eine schnelle Umsetzung der gelösten Wasserinhaltsstoffe ist ein hoher Anteil an Biomasse erforderlich. Um diesen sicherzustellen, wird ein Teil des Belebtschlammes als Rücklaufschlamm dem Einlauf des Belebungsbeckens zugeführt. Aufgrund der fehlenden Nähe zu einem entsprechend großen Vorfluter wird in der Kläranlage des Abwasserzweckverbandes Breisgauer Bucht als weiterer Verfahrensschritt eine Flockungsfiltration mit Sandfilter durchgeführt. Damit ist der in Ausnahmefällen erreichte, sehr geringe Verdünnungsfaktor von 1:2 im Vorfluter zu vertreten. In der Flockungsfiltration wird durch die Zugabe von dreiwertigen Metallen, hauptsächlich Aluminium und Eisen, die Abstoßung zwischen kolloidal gelösten Partikeln so weit herabgesetzt, dass diese agglomerieren. Die Abtrennung erfolgt in einem Sandfilter.

Mittels YES-Assay wurden Proben aus den verschiedenen Wasseraufbereitungsstufen der Kläranlage Breisgauer Bucht untersucht. In Abb. 31 sind die Ergebnisse der Kläranlagemessungen im Fließschema der Kläranlage nach dem Vorbild von Gujer (2002) dargestellt. Aufgeführt sind die Messwerte der estrogenen Aktivität im YES-Assay als EEQ in ng/L (unterer Wert). Der obere Wert ist die errechnete EEQ aus den Messwerten der chemischen Analytik.

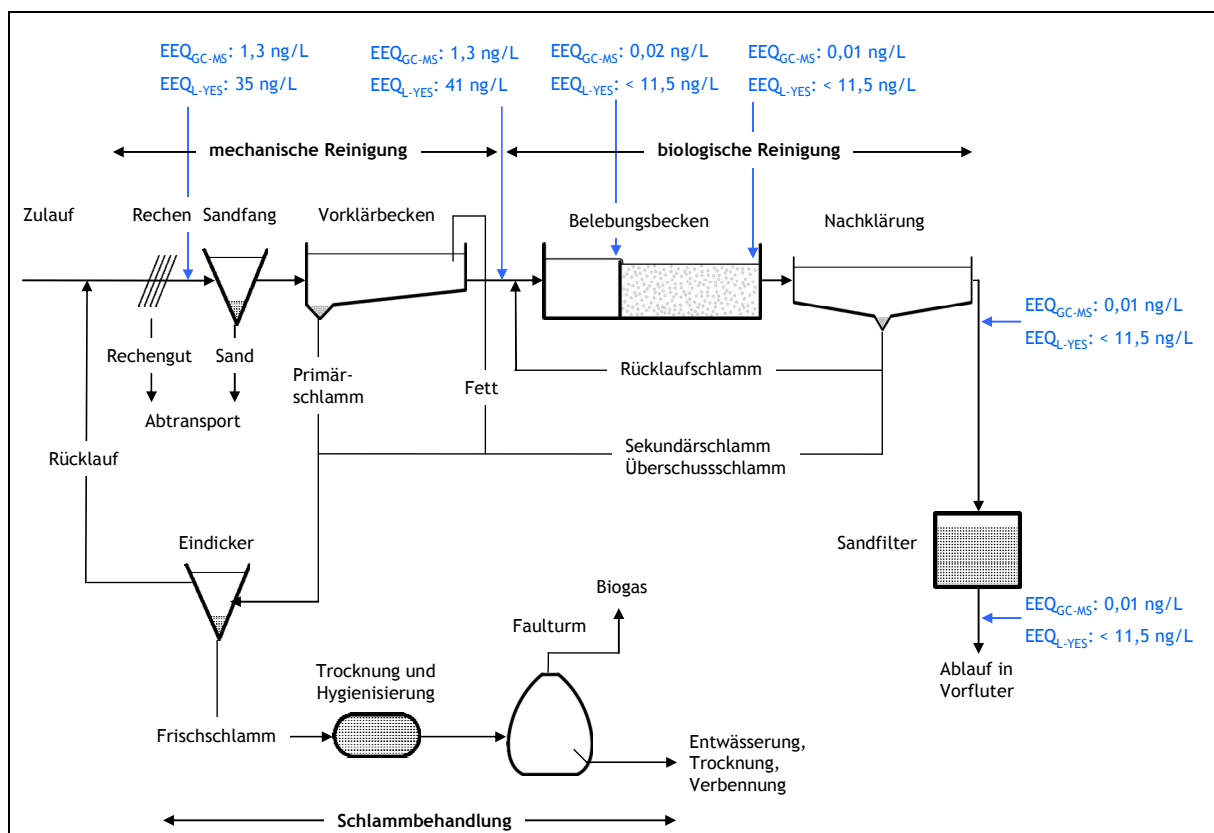


Abb. 31: Elimination der estrogenen Aktivität in der Kläranlage Breisgauer Bucht

Es ist eine gute Elimination der estrogenen Aktivität durch die Kläranlage Breisgauer Bucht zu erkennen. In der biologischen Reinigung findet die Hauptelimination der estrogenen Aktivität statt. Die errechnete EEQ bestätigt ebenfalls die Elimination von estrogenen Substanzen, jedoch weichen die Werte von den gemessenen EEQ ab. Für die Differenz zwischen  $EEQ_{\text{gemessen}}$  und  $EEQ_{\text{berechnet}}$  sind höchstwahrscheinlich Substanzen verantwortlich, die nicht durch die chemische Analytik erfasst werden. Diese Tatsache verdeutlicht den Vorteil des Biotest-Verfahrens, estrogenen Aktivität als Summenparameter zu erfassen. Mit dem YES-Assay wird die estrogenen Wirkung sämtlicher in der Probe enthaltener Substanzen ermittelt. Dabei werden auch Substanzen erfasst, die nicht im chemischen Monitoring enthalten waren.

Neben der Kläranlage Breisgauer Bucht wurden auch Proben aus der Kläranlage Karlsruhe-Neureut und weiteren Kläranlagen im süddeutschen Raum hinsichtlich ihrer Eliminationsleistungen in Bezug auf die estrogenen Wirkung untersucht. In Tab. 26 sind Messungen mittels L-YES-Assay als EEQ in ng/L aufgelistet.

**Tab. 26: Gemessene EEQ in ng/L von Proben aus weiteren Kläranlagen**

Zulauf	Belebung	Ablauf
55	32,4	< BG
70,3	61,6	< BG
44,7	< BG	< BG
93,4	< BG	< BG
183,1	< BG	< BG
147,4	< BG	< BG
105,1	< BG	< BG
< BG	-	-
< BG	-	-
< BG	-	-
31,1	-	< BG
< BG	-	< BG
< BG	-	< BG
-	-	< BG
-	-	< BG

Gemessen wurden Proben aus dem Zulauf, der Belebung und dem Ablauf der Kläranlagen. Bei Proben aus dem Ablauf der Kläranlagen lagen die Ergebnisse unterhalb der BG von

11,5 ng/L. Insgesamt konnte eine deutliche Abnahme der estrogenen Wirkung durch die Behandlung in den Kläranlagen beobachtet werden.

Je nach Größe, Geschlechter- und Altersverteilung sowie Verhütungsweise der Population im Einzugsgebiet können unterschiedliche Belastungen des Kläranlagenzulaufs beobachtet werden. Die estrogenen Aktivität reicht von unter 10 ng/L bis hin zu wenigen 100 ng/L (Braga et al., 2005; Combalbert, 2010; Limpiyakorn et al., 2011). Dies wurde durch die Werte dieses Projektes bestätigt. Die Elimination der estrogenen Aktivität findet vor allem durch die biologische Klärung statt. Verschiedene Quellen belegen, dass in den mechanischen Stufen weniger als 10% der Aktivität eliminiert wird, während die biologische Klärung eine Reduktion von über 90% erreichen kann (Braga et al., 2005; Combalbert, 2010; Klaus et al., 2008; Limpiyakorn et al., 2011).

Hauptmechanismen der Elimination sind Biodegradation sowie Sorption (Limpiyakorn et al., 2011). Die Rolle der Sorption wird jedoch kontrovers diskutiert (Andersen et al., 2003; Braga et al., 2005; Coleman et al., 2008; Combalbert, 2010; Servos et al., 2005; Yi et al., 2007). Je nach Veröffentlichung beträgt der aus dem Abwasser entfernte Anteil an der Gesamtbelastung unter 5% (Andersen et al., 2003), bis hin zu einer Elimination durch Sorption von 43% für E2 (Braga et al., 2005).

Als wichtigste Prozessparameter sind das Schlammalter sowie die hydraulische Aufenthaltszeit zu nennen. Daneben haben der Sauerstoffgehalt, der gesamte organische Kohlenstoff, sowie die Temperatur einen Einfluss (Combalbert, 2010). Während ein hohes Schlammalter (20 d) zu relativ hohen Abbauraten führt, ergibt sich für niedrigere Schlammalter (10 d) eine erhöhte Variabilität bei niedrigerem Abbau. Die Nitrifikation, und damit Sauerstoff als Elektronenakzeptor, ist notwendig um besonders persistente Substanzen wie EE2 abzubauen (Combalbert 2010). Zur zusätzlichen Elimination der estrogenen Aktivität im Effluent können Aktivkohlefilter oder Advanced Oxidation Prozesse nachgeschaltet werden, die die Gesamtelimination auf bis zu 99% steigern (Zeng et al., 2009).

Selbst bei optimalen Bedingungen kann der Kläranlagenablauf noch umweltrelevante estrogenen Aktivität aufweisen. Daher wird die Kontrolle sowohl im Effluent als auch im Vorfluter empfohlen, um bei einer Gefährdung zusätzliche Maßnahmen ergreifen zu können. Neben dem geklärten Wasser fällt in einem Klärwerk auch der stabilisierte Schlamm an. Wird dieser verbrannt spielt die estrogenen Belastung keine Rolle. Zum Teil wird dieser jedoch als Dünger auf Felder ausgebracht oder deponiert. Unter methanogenen Bedingungen findet kein oder nur ein geringer Abbau der estrogenen Aktivität statt (Citulski et al., 2010). Bei möglichen estrogenen Konzentrationen von 22 µg E2 und 18 µg EE2 pro kg Trockengewicht

ist jedoch eine Gefährdung der Umwelt bei landwirtschaftlicher Verwertung nicht ausgeschlossen (Combalbert, 2010).

## 11. Gefährdungsanalyse und Risikoabschätzung

Die mögliche Gefährdung von Mensch und aquatischem Ökosystem infolge endokrin aktiver Substanzen im Oberflächen-, Roh-, und Trinkwasser kann bislang nur schwer abgeschätzt werden. Vor diesem Hintergrund wurden die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie Daten aus der Literatur bewertet und eine Gefährdungsanalyse sowie Risikoabschätzung vorgenommen. Es wurden orientierende Vergleichsbetrachtungen zu anderen Aufnahmepfaden auf Basis der verfügbaren Literatur durchgeführt. Die Gefährdungsanalyse und Risikoabschätzung wurde in Anlehnung an den DVGW-Hinweis W1001 durchgeführt. Für ein besseres Verständnis des Themas werden die wichtigsten Begriffsdefinitionen aus dem Hinweis W1001 im Folgenden aufgeführt.

**Ereignis:** Auslöser, der direkt oder indirekt zum Eintreten einer Gefährdung im Versorgungssystem führt.

**Gefährdung:** Mögliche biologische, chemische, physikalische oder radiologische Beeinträchtigung im Versorgungssystem. In dieser Studie wird die Gefährdung durch mögliche estrogenen Einträge in Abwasser bzw. in Oberflächenwasser betrachtet.

**Gefährdungsanalyse:** Systematische Ermittlung von Gefährdungen und Ereignissen in den Prozessen der Wasserversorgung.

**Maßnahmen zur Risikobeherrschung:** Handlungen und Prozesse, die die Versorgungssicherheit in der Wasserversorgung gewährleisten. Diese können auch vorbeugenden Charakter haben.

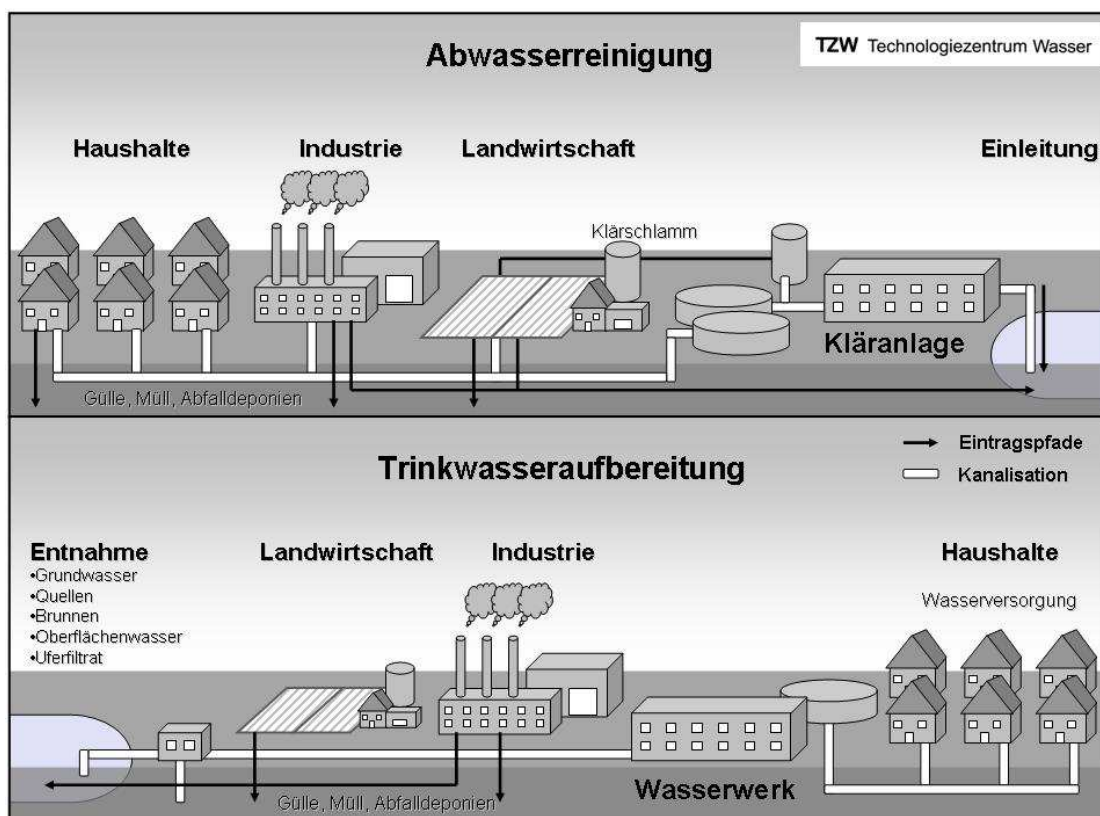
**Risiko:** Kombination von Eintrittswahrscheinlichkeit und Schadensausmaß einer Gefährdung im Versorgungssystem. Im Rahmen dieser Studie ist ein Risiko die Kombination aus der Eintrittswahrscheinlichkeit einer Kontamination des Rohwassers bzw. Trinkwassers, sowie der Beurteilung des möglichen Schadensausmaßes im Vergleich zu anderen Expositionspfaden.

**Risikoabschätzung:** Einsatz verfügbarer Informationen zur Analyse und Bewertung von Risiken.

## 11.1. Gefährdungsanalyse

Die Gefährdungsanalyse dient dazu, mögliche Gefährdungen für die Wasserversorgung zu identifizieren und denkbare Ereignisse, die zum konkreten Eintreten einer Gefährdung führen können, zu ermitteln. Es soll geklärt werden, an welcher Stelle und in welcher Art und Weise diese Gefährdungen auftreten können.

Ziel der hier durchgeführten Gefährdungsanalyse ist ausschließlich die Ermittlung von möglichen Gefährdungen durch endokrin aktive Stoffe. Dazu muss man sich fragen, wie diese endokrin aktiven Stoffe ins Wasserversorgungssystem gelangen können. In Abb. 32 wird der „Wasserkreislauf des Wasserversorgungssystems“ dargestellt. Dieser Wasserkreislauf stellt mögliche Quellen estrogen aktiver Stoffe schematisch dar und hilft Gefährdungen zu identifizieren.



**Abb. 32: Wasserkreislauf des Wasserversorgungssystems**

Der Eintrag von endokrinen Disruptoren in die Umwelt kann vielfältig sein. Beschriebene Eintragspfade in die aquatische Umwelt sind kommunale Abwässer (Baronti et al., 2000; Klaus et al., 2008), aber auch Industrie- und landwirtschaftliche Abwässer. Der Eintrag kann ebenfalls durch Bodenbelastung aus der Landwirtschaft (Combalbert, 2010) und Abfallab-

lagerungen (Kang et al., 2006) von statten gehen. Der Haupteintrag von endokrin wirksamen Substanzen ist aber auf menschliche sowie tierische Ausscheidungen und Industrieabwässer zurückzuführen. So sind Kläranlagen einschließlich der entsprechenden Klärschlämme Belastungsschwerpunkte für endokrin wirksame Verbindung. Durch die Entnahme von Rohwasser zur Trinkwasseraufbereitung können diese endokrin aktiven Substanzen möglicherweise ins Wasserversorgungssystem gelangen.

## 11.2. Risikoabschätzung

Im ersten Schritt der Risikoabschätzung, der sog. Risikoanalyse, werden die bereits identifizierten Gefährdungen anhand ihres Risikos analysiert. Das Risiko ergibt sich aus der Kombination von Schadensausmaß und Eintrittswahrscheinlichkeit der identifizierten Gefährdungen. Um das Schadensausmaß und die Eintrittswahrscheinlichkeit abschätzen zu können, muss vor allem das Auftreten von endokrinen Disruptoren in kommunalen, landwirtschaftlichen und industriellen Abwässern, aber auch ihr Abbauverhalten und ihre Verbreitung in der aquatischen Umwelt näher betrachtet werden.

### **Auftreten von endokrinen Disruptoren in kommunalen, landwirtschaftlichen und industriellen Abwässer**

Kommunale Abwässer sind v.a. durch die sehr aktiven Steroidhormone geprägt. Diese Steroidhormone werden im Körper gebildet, können aber auch zur Wachstumssteigerung in der Tierzucht, sowie zur Empfängnisverhütung, zur Hormonersatztherapie oder zur Krebsbehandlung zusätzlich aufgenommen werden. Dabei werden sowohl die natürlichen Hormone, die im Körper produziert werden (z.B., E1, E2, E3), als auch die synthetischen Hormone, die in Form von Pharmaka aufgenommen werden (v.a. EE2, MeEE2 in der Antibabypille), mit beispielsweise Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert. Die Konjugation macht die Steroidhormone wasserlöslicher und auf diese Weise können sie mittels Urin ausgeschieden werden. Desbrow et al. (1998) beschreiben jedoch eine Dekonjugation durch fäkale Bakterien während der Abwasserbehandlung, sodass die Hormone in aktiver Form in die Umwelt eingetragen werden. Tennhardt et al. (2004) bezieht sich auf die Werte von Ternes et al. (1999b), welche eine Ausscheidung von bis zu 64 µg/Tag E3, 0,5-5 µg/Tag E2, sowie 3-20 µg/Tag E1 für Frauen beschreiben. Tennhardt (2004) weist darauf hin, dass diese Ausscheidung abhängig von Zyklusphase, Schwangerschaft und Lebensphase der Frauen ist. Zusätzlich gibt er eine Sekretion von Steroidhormonen für Männer von bis zu 22 µg/L an. Tennhardt (2004) berechnet auf Grund dieser und weiterer Literaturdaten die



Gesamtausscheidung an Steroidhormonen der deutschen Bevölkerung auf 674 kg im Jahr. Hierbei wurden keine Werte zur Exkretion von Steroidhormonen aus der Tiermast bzw. der Hormonersatztherapie berücksichtigt. Hintemann (2006) beschreiben basierend auf Modellannahmen von Johnson et al. (2004) eine durchschnittliche Ausscheidung von 6,6 µg E2 pro Tag und Kopf. Verrechnet mit der Bevölkerungsanzahl (82 Mio.) ergibt sich für Deutschland eine E2-Ausscheidung von ungefähr ~198 kg pro Jahr. Über menschliche Ausscheidungen kann also ein relevanter Eintrag in die Umwelt bzw. in den Wasserkreislauf erfolgen.

Landwirtschaftliche Abwässer sind geprägt durch estrogen aktive Stoffe in tierischen Ausscheidungen. Tennhardt (2004) beschreibt in seiner Aufstellung eine Sekretion von Steroidhormonen durch Tiere, z.B. von trächtigen Stuten von bis zu 100.000 µg/Tag. In einer weiteren Quelle reicht die Ausscheidung in der Tierzucht von 0,2 µg Estrogen pro Tag durch Masthähnchen bis über 2 mg Estrogen pro Tag durch Eber und trächtige Kühe (Hintemann, 2006). Dies zeigt die starke Abhängigkeit der Einträge von u.a. Tierart, Geschlecht, Trächtigkeit. Phytohormone und Mykohormone sind nicht nur Pflanzenbestandteile und somit Teil der menschlichen Nahrung, sondern werden vor allem in Form von Mais, Klee, proteinreichem Soja und anderen Pflanzenteilen zu Tierfutter verarbeitet. Mitsch et al. (2001) untersuchten Schweinefutter mittels E-Screen auf ihre estrogen Aktivität und stellten fest, dass diese eine EEQ von 10-80 µg pro Tag mit dem Futter aufnehmen. Estrogen aktive Substanzen können durch Abwasser in die Kläranlage, aber auch über die Viehhaltung bzw. dem Austrag von Gülle, Mist, Kot und Jauche in die Umwelt gelangen. Insgesamt wird aber deutlich, dass die landwirtschaftliche Tierproduktion eine große Eintragsquelle von estrogen aktiven Substanzen in die Umwelt darstellen kann.

Industrielle Abwässer sind vor allem geprägt durch die sogenannten Xenohormone. Diese können beispielsweise sowohl Industriechemikalien und deren Abfallprodukte, sowie Haushaltschemikalien und Pflanzenschutzmittel beinhalten. Ein Beispiel ist BPA, das in verschiedenen Kunststoffen verwendet wird, und u.a. in CDs, DVDs, Thermopapier und in Plastikflaschen vorkommt. Viele Xenohormone wie Phenole und Phthalate sind Bestandteile von Kunststoffen. Wagner et al. (2011b) untersuchten im Auftrag des Umweltbundesamtes die Expositionspfade von Umwelthormonen aus Kunststoffen. Bei ihren Migrationsversuchen konnte im Maximum eine Freisetzung von ca. 25 ng EEQ/L aus einer einzelnen Verpackungseinheit oder ca. 280 ng EEQ/L aus 10 g Kunststoffgranulat über 10 Tage gemessen werden. Die untersuchten Kunststoffe setzten alle estrogen aktive Stoffe frei, außerdem ergab eine Untersuchung von Mineralwasser im Maximum eine Migration von ca. 2500 ng EEQ/L über 40 Tage. Wagner et al. (2011b) kalkulierten eine Freisetzung von ca. 28 ng EEQ/L pro Tag aus Kunststoffgranulaten in Wasser, wobei diese auch über die Kläranlagen

ins Gewässer gelangen können. Auch über Wasserleitungsrohre können estrogen aktive Substanzen durch Migration ins Wasser-Verteilungsnetzwerk gelangen.

Insgesamt wird deutlich, dass der Eintrag von mehreren Faktoren abhängt, wie Produktionsmenge, Metabolisierung, Verwendungszweck, Entsorgung und Abbauverhalten. Schließlich können estrogen weniger potente Umweltchemikalien durch einen relativ hohen Eintrag in die Umwelt ein ähnliches Risiko, wie die sehr potenten Steroidhormone darstellen, die eher im ng/L Bereich vorkommen.

### **Abbau der endokrinen Disruptoren in Kläranlagen**

In der Kläranlage werden die endokrinen Disruptoren teilweise eliminiert. Die Elimination beruht hierbei vor allem auf biologischen Prozessen. Dabei wurden neben unterschiedlichen Redoxbedingungen auch verschiedene Konzentrationsbereiche untersucht (Combalbert, 2010). Zusätzlich spielt die Zusammensetzung der Matrix, die Temperatur sowie die Biozönose eine entscheidende Rolle für die ermittelten Abbauraten. Daher ist die Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit verschiedener Ergebnisse zum Teil nicht gegeben. Dennoch sind wesentliche Aussagen zur Abbaubarkeit verschiedener Substanzen möglich. Im Rahmen dieser Studie wurden ebenfalls Abbauprobversuche durchgeführt. Unter aeroben Bedingungen konnten Halbwertszeiten für BPA und 2-HBP, sowie E1, E2, E3, MeEE2 und EE2 von wenigen Tagen bis Wochen ermittelt werden. Unter Ausschluss von Sauerstoff werden deutlich längere Abbaupzeiten beobachtet. Während E2 unter anaeroben Bedingungen relativ gut abbaubar war, wurden die anderen untersuchten Substanzen kaum bzw. gar nicht abgebaut (siehe Kapitel 8. „Biologischer Abbau unter definierten Randbedingungen“).

Trotz des relativ guten Abbauverhaltens in Laborversuchen, zeigen einige Publikationen das Auftreten von endokrinen Disruptoren in Kläranlagenabläufen. Es konnten Konzentrationen von 10 ng/L-16 µg/L an Phenolen, 0,4-96 ng/L an Steroidhormonen, 0,5-1,7 ng/L an synthetischen Hormonen und 3-65 ng/L an Phytohormonen in Kläranlagenabflüssen gemessen werden (siehe Tab. 1). Dies zeigt, dass diese Verbindungen während des Klärprozesses meist nur unvollständig eliminiert werden. Die bisherigen Untersuchungen zu endokrin wirksamen Substanzen in Kläranlagenzu- und -abläufen ergaben, dass die gefundenen Konzentrationen abhängig vom Untersuchungsort und -zeitpunkt sehr unterschiedlich sind. Tab. 27 gibt hierzu einen Überblick über die EEQ-Literaturwerte verschiedener Kläranlagen.

**Tab. 27: Gesamt-Estrogenität verschiedener Kläranlagenproben als EEQ (Höchstwerte)**

Quelle	KA-Zufluss	KA-Abfluss	Proben-anzahl	Testsystem	Land
	EEQ in ng/L	EEQ in ng/L			
Escher et al., 2008b	123,4	1,2	3	YES/SPE	Schweiz
Witters et al., 2001	81,4	-	16	YES/SPE	Belgien
Körner et al., 2000	96	9,7	2	E-Screen/SPE	Deutschland
Körner et al., 2001	-	11,3	16	E-Screen/SPE	Deutschland
Huggett et al., 2003	-	15	3	YES/SPE	USA
AFU, 2012	-	8,1	44	YES/SPE	Schweiz
Samarah et al., 2006	-	34,8	3	ERBA*	Neuseeland
Krein et al., 2012	-	32	33	YES/SPE	Luxemburg
Pawlowski et al., 2003	-	27,1	2	YES/SPE	Deutschland
Pawlowski et al., 2004	-	76,4	2	YES/SPE	Deutschland
Vethaak et al., 2005 <sup>1</sup>	74,9	0,6	13, 10	ER-CALUX	Niederlande
Vethaak et al., 2005 <sup>2</sup>	152,6	2,6	5, 3	ER-CALUX	Niederlande
Samarah et al., 2006	564	-	9	ERBA*	Neuseeland

<sup>1</sup> städtisches Abwasser

\*Estrogen receptor competitive binding assay

<sup>2</sup> industrielles Abwasser

k.A. = keine Angaben

Witters et al. (2001) beschrieben, dass 7 von 16 untersuchten Kläranlagenproben eine EEQ von über 10 ng/L aufwiesen. Samarah et al. (2006) untersuchten das Abwasser verschiedener Viehzuchtbetriebe und konnten eine EEQ von über 500 ng/L bei Milchkuhzucht (n=7), etwa 33 ng/L bei Schweinezucht (n=1), sowie etwa 60 ng/L in der Ziegenzucht nachweisen (n=1). Außerdem konnten E2-Konzentrationen von 19-1360 ng/L gemessen werden, was auffallend hoch ist im Vergleich zur Konzentration von Proben aus Kläranlagenzuflüssen von bis zu 37 ng/L (siehe Tab. 1). Ein weiteres Beispiel liefern Vethaak et al. (2005), indem sie die EEQ von industriellen Abwasser (152,6 ng/L) und städtischen Abwässern (74,9 ng/L) untersuchten (siehe Tab. 27 und

Tab. 28). Insgesamt zeigen diese Beispiele, dass vor allem landwirtschaftliche und industrielle Abwässer Kontaminationsschwerpunkte sind.

Die Werte dieses Projektes bestätigen, dass EEQ in Proben von Kläranlagenzuflüssen im zweistelligen ng/L-Bereich durchaus auftreten. Die Literaturwerte zeigen, dass dies in Proben aus Kläranlagenabflüssen auch der Fall sein kann. Dies kann durch die Daten dieses Projektes nicht bestätigt werden, da die EEQ aller untersuchten Abflüsse unter 11,5 ng/L lagen.

### **Estrogene Aktivität in verschiedenen Umweltkompartimenten**

Estrogen aktive Substanzen konnten aber in der Vergangenheit nicht nur in Kläranlagenabläufen, sondern auch in verschiedenen Oberflächenwässern und anderen aquatischen Kompartimenten nachgewiesen werden. Eine Zusammenstellung der estrogenen Aktivität in verschiedenen Umweltkompartimenten findet sich in der Tab. 28.

**Tab. 28: Gesamt-Estrogenität verschiedener Umweltproben (Höchstwerte)**

	EEQ in ng/L	Land	Test-system	Proben-anzahl	Quelle
<b>Oberflächenwasser</b>	292,0	Großbritannien	YES/SPE	25	Matthiessen et al., 2006
	32,2	China	Estrogen Rezeptor in die MVLN- Zelllinie	44	Shue et al., 2009
	20,8	Luxemburg	YES/SPE	33	Krein et al., 2012
	22,2	Deutschland	YES/SPE	4	Pawlowski et al., 2004
	7,0	Schweiz	YES/SPE	36	Vermeirssen et al., 2005
	1,6	Deutschland	YES/SPE	1	Pawlowski et al., 2003
	0,63	Schweiz	YES/SPE	4	Escher et al., 2008b
	0,166	D/F/NL/B	ER-CALLUX/ SPE	27	Ghijssen et al., 2000
	0,045	D/F/NL/B	ER-CALLUX/ SPE	20	Ghijssen et al., 2000
	0,17	Niederlande	ER-CALLUX	90	Vethaak et al., 2005
<b>Polderwasser</b>	0,2	Niederlande	ER-CALLUX	11	Vethaak et al., 2005
<b>Regenwasser</b>	0,06	Niederlande	ER-CALLUX	3	Vethaak et al., 2005
<b>Grundwasser</b>	2,9	Deutschland	YES/SPE	30	Wölz et al., 2011
<b>Quellwasser</b>	4,8	USA	E-Screen/ SPE	18	Stanford et al., 2010
	< 0,1	USA	E-Screen/ SPE	18	Lange et al., 2013
<b>Rohwasser</b>	2,1	USA	E-Screen/ SPE	17	Stanford et al., 2010
<b>Trinkwasser</b> aus Oberflächenwasser aus Grundwasser aus Quellwasser	0,77	USA	E-Screen/ SPE	31	Stanford et al., 2010
	17,2	Italien	YES/SPE	1	Pinto et al., 2009
	15,1	Italien	YES/SPE	1	Pinto et al., 2009
	0,46	Italien	YES/SPE	1	Pinto et al., 2009
	0,201	NL	ER-CALLUX/ SPE	26	Ghijssen et al., 2000
	0,028	NL	ER-CALLUX/ SPE	19	Ghijssen et al., 2000
<b>Leitungswasser</b>	0,2	USA	E-Screen / SPE	15	Snyder et al., 2008

k.A.= keine Angaben

Insgesamt zeigen die Daten aus der Literatur, dass endokrine Wirkungen in der aquatischen Umwelt weit verbreitet sind. Insbesondere die Werte von Pinto et al. (2009) zeigen, dass besonders dort, wo zur Trinkwassergewinnung Oberflächenwasser oder durch Oberflächen-

wasser beeinflusstes Grundwasser verwendet wird, Trinkwasserkontaminationen durch endokrin wirksame Substanzen möglich sind.

### 11.3. Vergleichende Risikobewertung

Im zweiten Schritt der Risikoabschätzung, der sog. Risikobewertung, lassen sich mögliche Gefährdungen hinsichtlich ihres Risikos bewerten. Zum Beispiel können die Substanzen in die Sexualhormonsysteme, aber auch in den Schilddrüsenhormonkomplex eingreifen (Brouwer, 1998), zudem wurde in der Vergangenheit über eine Vielzahl von Auswirkungen auf das Reproduktionssystem wildlebender Tiere berichtet. Neben der Feminisierung von männlichen sowie einer Vermännlichung von weiblichen Tieren treten hauptsächlich Fertilitätsstörungen, Stoffwechselanomalien und Verhaltensstörungen, ein geringer Bruterfolg sowie eine Veränderung des Geschlechterverhältnisses von Wildtieren auf (Schultis, 2005).

Negative Effekte einer endokrinen Belastung konnten bei einigen Invertebraten (z. B. Matthiessen et al., 1998; Zou et al., 1999) sowie in allen Wirbeltierklassen nachgewiesen werden. So wurden beispielsweise Verweiblichungsphänomene (Purdom et al., 1994, Harries et al., 1997) und der Rückgang von Alligatorpopulationen (Guillette et al., 1994 und 1995) beobachtet.

Neben Auswirkungen auf die Tierwelt gibt es auch Anzeichen möglicher hormonell bedingter Wirkungen auf den Menschen. Untersuchungen konnten belegen, dass Lebensmittel estrogen wirksame Substanzen beinhalten (Fritsche und Steinhard, 1999; Holtney-Weber, 2000; Heemken et al., 2001). Diese Substanzen werden in Zusammenhang mit einer verringerten Spermienzahl und -mobilität bei Männern (Beresford et al., 2000; Schultis, 2005; Sharpe et al., 1993; Toppari et al., 1996) und einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei Frauen (Safe, 1997; Wolff et al., 1993) gebracht.

Ghijzen et al. (2000) bewerteten die Wasserproben aus der Meuse in Frankreich und dem Rhein anhand eines Wertes von 0,3 ng/L EEQ (Job et al., 1993; Har et al., 1999). Ab 0,3 ng/L EEQ und höher, ergibt sich ein Effekt auf die Vitellogenin-Produktion von Fischen in Oberflächengewässern. Ghijzen et al. (2000) verwendeten den Wert als maximal akzeptablen Wert für die Trinkwassergewinnung. Sie kommen dabei zu dem Schluss, dass bei keiner der untersuchten Proben ein Gesundheitsrisiko bestand.

Vergleichend zum theoretisch denkbaren Trinkwasserpfad werden im Folgenden auch andere Expositionspfade diskutiert, um Verhältnismäßigkeiten abschätzen zu können. Zhang et al. (2012) fanden heraus, dass die Ester der Salicylsäure teilweise eine höhere estrogen Aktivität als BPA besitzen können. Diese werden eingesetzt als Duftstoffe und UV-Filter in

der Kosmetikindustrie, sowie beispielsweise als Antirheumatika. Zhang et al. (2012) berechneten, dass die Aufnahme 162 ng/kg pro Tag betrug, was 3,3-fach höher liegt als die maximal akzeptable tägliche Aufnahme gemäß Festlegung des FAO/WHO Experten Committee on Food Additives (JECFA). Stanford et al. (2010) untersuchten die Exposition von estrogener Aktivität über Trinkwasser, Lebensmittel, Kosmetika und Luft. Sie fanden lediglich in drei Proben von amerikanischen Trinkwässern messbare estrogene Aktivität von 0,19-0,7 ng/L (EEQ) und gaben an, dass die Exposition über Nahrungsmittel und Getränke 4-21.000-mal höher und die Exposition über die Luft 30-36.000-mal höher ausfällt (siehe Tab. 29 und Tab. 30).

**Tab. 29: Vergleich verschiedener Expositionspfade für Estrogene (EEQ)**

	Exposition in ng/Tag	Grundlage	Quelle
Lebensmittel	500 ng/Tag	Bier, Wein, Milch, Soja	Hartmann et al., 1998
Lebensmittel	27,5-34 ng/Tag	Fleisch, Käse, Fisch, Soja, Schokolade, Brot	Behr et al., 2011
Luft (Büro)	4,5 ng/Tag	24 m <sup>3</sup> /Tag	Stanford et a., 2010;
Luft (Stadt)	0,04 ng/Tag	24 m <sup>3</sup> /Tag	Kennedy et al., 2009

Dies kann durch weitere Werte der Literaturrecherche bestätigt werden (siehe Tab. 30). Dort wurden verschiedene Werte zur täglichen Aufnahme, sowie Gehalte verschiedener Lebensmittel berechnet. Beispielsweise kann bei dem Verzehr von einem Glas (ca. 0,2 L) Sojamilch eine Einnahme von 840 ng EEQ errechnet werden. Beim Verzehr von Eiern (ca. 75 g) ist mit einer Einnahme von 113 ng E2 zu rechnen. Im Gegensatz dazu ist für Deutschland bisher kein Befund einer estrogenen Aktivität in Trinkwasser bekannt.

**Tab. 30: Gesamt-Estrogenität verschiedener Lebensmittel als EEQ bzw. E2-Konzentration**

	EEQ	Probenanzahl	Quelle
Flaschenwasser (PET)	2,7-75,2 ng/L	9	Wagner et al., 2009
Flaschenwasser (Glas)	2,6-73,0 ng/L	9	Wagner et al., 2009
Flaschenwasser (Tetra Pak)	14,5-43,9 ng/L	2	Wagner et al., 2009
Flaschenwasser	1-34 ng/L	42	Plotan et al., 2013
Flaschenwasser (PET)	0,9-23,1 ng/L	9	Pinto et al., 2009
Flaschenwasser	< 0,16 ng/L	5	Snyder et al., 2008
Flaschenwasser (PET)	< 0,1 ng/L	15	Lange et al., 2013
Flaschenwasser (Glas)	< 0,1 ng/L	15	Lange et al., 2013
Flaschenwasser (PET)	0,6-12,2 pg/L	12	Wagner et al., 2011a
Flaschenwasser (Glas)	1,6-4,9 pg/L	5	Wagner et al., 2011a
Flaschenwasser (Tetra Pak)	3,0 pg/L	1	Wagner et al., 2011a
Flaschenwasser (PET und Glas)	1,5-8 pg/L	24	Brüschweiler et al., 2011
Sojamilch	1900-4200 ng/L	3	Snyder et al., 2008
Säuglingsmilchnahrung (Soja)	1500-1900 ng/L	2	Snyder et al., 2008
Sojasoße	28-510 ng/L	4	Snyder et al., 2008
Bier	0,8-140 ng/L	5	Snyder et al., 2008
Milch *	9,8-44,3 ng/L	12	Courant et al., 2007
Grüner Tee	1,5-4,4 ng/L	4	Snyder et al., 2008
Kaffee	2,6-4,1 ng/L	4	Snyder et al., 2008
Gemüsesäfte	2,1-3,3 ng/L	4	Snyder et al., 2008
Säuglingsmilchnahrung	0,73-0,85 ng/L	2	Snyder et al., 2008
Milch	0,48-0,81 ng/L	3	Snyder et al., 2008
Apfelsaft	0,73-0,79 ng/L	4	Snyder et al., 2008
Lebensmittel (mit Soja)	100-1500 ng/kg	4	Behr et al., 2011
Lebensmittel (ohne Soja)	10-40 ng/kg	19	Behr et al., 2011
Säuglingsmilchnahrung	14-22 ng/kg	3	Behr et al., 2011
Lebensmittel (Gemüse/Früchte)	1500-3200 ng/kg	44	Schilirò et al., 2011
Eier *	0,5-1,5 µg/kg	8	Courant et al., 2007

\* nicht als EEQ angegeben, sondern als E2-Konzentration

Als Grundlage für die Festlegung von Umweltqualitätsnormen (UQN) dienen PNEC-Werte (Predicted-No-Effect-Concentration). Eine PNEC ist die Konzentration eines Stoffes in einem Umweltkompartiment (hier: aquatisches System), bei der mit hoher Wahrscheinlichkeit keine unerwünschten Wirkungen auf Lebewesen auftreten. Laut Europäische Kommission (EC, 2003) wird zur Berechnung einer PNEC die ermittelte NOEC (no observed effect concentration) für den empfindlichsten Organismus eines Gewässers verwendet. Man



verwendet dazu ökotoxikologische Daten von Wasserorganismen aus drei trophischen Stufen (Stellung in der Nahrungskette), z.B. Alge (Pflanzen), Wasserfloh (Wirbellose) und Fisch (Wirbeltier). Die verbleibende Unsicherheit wird durch Einrechnen eines Sicherheitsfaktors entlastet. Dieser ist allerdings abhängig von der Anzahl der Organismen, der trophischen Stufen und der Art des ökotoxikologischen Parameters. Zu diesem Zweck veröffentlichte die Europäische Kommission (EC, 2003) eine Übersichtstabelle der zu verwendenden Sicherheitsfaktoren. Generell gilt, je mehr Organismen und/oder trophische Stufen untersucht wurden, sowie je robuster der Parameter, desto niedriger die Unsicherheit und der verwendete Sicherheitsfaktor. In Tab. 31 ist eine Übersicht über einige PNEC, sowie vorgeschlagene UQN (Umweltqualitätsnormen) zusammengestellt.

**Tab. 31: PNEC bzw. UQN in ng/L ausgewählter endokriner Disruptoren**

		Substanz						
		E2	EE2	E1	MeEE2	BPA	NP	OP
PNEC	ARCEM, 2003	1	0,1	3	-	1600	330	100
	Bergmann et al., 2011	0,02	0,01	100	20	-	-	200
	Cadwell et al., 2012	1	0,1	6	-	-	-	-
	Leisewitz et al., 1997	-	-	-	-	1000	-	-
	Staples et al., 2000	-	-	-	-	64000	-	-
UQN	Moltmann et al., 2007	0,5	0,03	-	-	0,8	3,3	-
	Watch-Liste (EC, 2013)	0,4 <sup>a</sup>	0,007 <sup>a</sup>	-	-	-	300 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
		0,08 <sup>b</sup>	0,035 <sup>b</sup>	-	-	-	2000 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>
<b>Estrogene Potenz als 17β-Estradiol-Äquivalenzfaktor</b>		<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0068</b>	<b>0,0046</b>	<b>6,8E-05</b>	<b>8,1E-06</b>	<b>4,5E-06</b>

<sup>a</sup> Binnenoberflächengewässer

<sup>b</sup> Sonstige Oberflächengewässer

Die nähere Betrachtung der UQN macht deutlich, dass bereits das Auftreten von endokrin aktiven Substanzen im absoluten Spurenstoffbereich (pg/L-Bereich) zu einer Überschreitung dieser Normen führen kann. Für das sehr potente synthetische Hormon EE2 und das natürliche Hormon E2 liegen die UQN-Kriterien unter 1 ng/L.

#### 11.4. Maßnahmen zur Reduktion estrogener Substanzen

Die bisherigen Ausführungen belegen das geringe Risiko der Aufnahme von estrogenen Substanzen über den Trinkwasserpfad. Viele estrogen wirksame Substanzen, die über

Abwasser in die Oberflächengewässer gelangen, unterliegen dort und bei der Uferfiltration einem weiteren mikrobiologischen Abbau.

Im Sinne des Ressourcenschutzes und zum Schutz aquatischer Ökosysteme sind folgende Maßnahmen zur Reduktion der Einträge in Gewässer geeignet (Larsen et al., 2004):

- Optimierung der existierenden Abwasserreinigungsanlagen
- Ausbau der Abwasserreinigungsanlagen
- Separation und Kontrolle von Kontaminationsherden

Eine Optimierung bzw. ein Ausbau der bestehenden Abwassereinigungsanlagen kann durch biologische (mikrobiologischer Abbau), chemische (Ozonung) und physikalische Verfahren (Sorption, Filtration) erfolgen. In dieser Studie wurde bestätigt, dass der aerobe mikrobiologische Abbau im Belebungsbecken der Kläranlage eine effiziente Methode zur Minderung estrogenen Substanzen darstellt.

Zur Kontrolle der Wasserbeschaffenheit sind chemisch-analytische Methoden zum Nachweis bekannter Estrogene geeignet. Eine zusätzliche Überwachung mittels biologischer Wirktests wie dem L-YES-Test erhöht die Aussagesicherheit, da auch das Vorkommen bisher unbekannter estrogenen Substanzen sowie von estrogen wirksamen Abbauprodukten erfasst wird.

## 12. Zusammenfassung

Beobachtungen von Entwicklungsstörungen wie z.B. die Vermännlichung weiblicher Tiere und eine reduzierte Fruchtbarkeit bei aquatischen Wildtieren, ließen in den letzten Jahren Befürchtungen aufkommen, dass über den Trinkwasserpfad aufgenommene Stoffe die menschliche Gesundheit gefährden können. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Studie die aktuelle Literatur ausgewertet und ein Hefezell-basiertes Verfahren (Yeast Estrogen Screen, YES) zum Nachweis estrogenen Wirkungen evaluiert und zur Untersuchung des Vorkommens und Abbauverhaltens estrogen aktiver Substanzen eingesetzt.

Die Analyse von estrogen aktiven Modellsubstanzen zeigte eine gute Reproduzierbarkeit und ergab eine Bestimmungsgrenze von  $11,5 \pm 2,9$  ng/L für  $17\beta$ -Estradiol. Die gängigen Festphasen zur Aufkonzentration erwiesen sich als ungeeignet, da hohe Blindwerte auftraten. Im Rahmen der Evaluierung wurde geprüft, ob die Matrices von Umweltproben den Test stören, und ob Substanzverluste bei der Inkubation auftreten können. Insgesamt zeigten die Evaluierungsergebnisse, dass mit Kläranlagenablauf oder Oberflächenwasser

nur geringe Matrixeffekte auftreten. Substanzverluste wurden bei besonders hydrophoben Modellschubstanzen beobachtet.

Im Vergleich zu Zellkulturverfahren ist die Durchführung des YES-Tests vergleichsweise einfach. Die folgenden Massnahmen zur Qualitätssicherung sind dabei einzuhalten: die Protokollierung der Zelldichte, die Mitführung von Positivkontrollen und Negativkontrollen, sowie die adäquate Lagerung und zeitnahe Vermessung der Proben. Insgesamt steht mit dem YES-Assay ein einfacher und robuster biologischer Test zur Erfassung der endokrinen Aktivität von Umweltproben zur Verfügung, der eine wichtige Ergänzung zur chemischen Analytik darstellt.

Der Hefezell-Estrogentest zeigte keine estrogenere Wirkung in 24 Oberflächenwasserproben. Die Untersuchung von Proben aus der Kläranlage ergab Zulaufkonzentrationen von bis zu 70,3 ng/L EEQ (Estradiol-Äquivalent-Konzentration). Insgesamt zeigten die Ergebnisse des YES-Tests einen deutlichen Rückgang des endokrinen Potenzials während der Abwasserbehandlung. Die mittels YES-Assay erfasste estrogenere Wirkung der Proben war dabei nicht allein auf die mittels chemischer Analytik erfassten Konzentrationen an synthetischen und natürlichen Steroiden sowie der Alkylphenole 4-tert.-Octylphenol, 4-iso-Nonylphenol und Bisphenol A zurückzuführen. Der Vergleich der chemischen Analytik mit dem YES-Test zeigte damit, dass der biologische Wirktest weitere, chemisch nicht identifizierte Substanzen erfasst.

In Abbaubersuchen wurde ein guter Abbau der untersuchten Substanzen unter aeroben Bedingungen beobachtet. Ein schlechterer Abbau der natürlichen und synthetischen Hormone sowie der Umweltchemikalien 2-Hydroxybiphenyl und Bisphenol A wurde unter anaeroben Bedingungen beobachtet. Insbesondere unter Fe(III)- und Sulfat-reduzierenden Bedingungen führte die mikrobiologische Transformation eines spezifischen Hormons zum Anstieg anderer estrogen wirksamer Verbindungen. Bei den Abbaubersuchen wurden zum Teil noch erhöhte Werte im YES-Test festgestellt, nachdem die estrogenen Ausgangsverbindungen schon nicht mehr chemisch analytisch nachweisbar waren. Offenbar kommt es zwischenzeitlich zur Bildung von unbekanntem Abbauprodukten, die noch estrogenere Wirkung aufweisen.

Auf Basis der Ergebnisse dieser Studie und einer umfassenden Literaturlauswertung wurde eine Gefährdungsanalyse und Risikoabschätzung durchgeführt. Im Ergebnis ist eine Beeinträchtigung durch estrogen wirksame Stoffe über den Trinkwasserpfad als gering einzustufen. Trotzdem ist aus Gründen der Vorsorge zu fordern, dass insbesondere der Eintrag von schwer abbaubaren anthropogenen Stoffen mit endokrinem Potenzial in die aquatische Umwelt kontrolliert und weiter reduziert wird.

Zur Kontrolle der Wasserbeschaffenheit sind chemisch-analytische Methoden zum Nachweis bekannter Estrogene geeignet. Eine zusätzliche Überwachung mittels biologischer Wirktests wie dem L-YES-Test erhöht die Aussagesicherheit, da auch das Vorkommen bisher unbekannter estrogener Substanzen sowie von estrogen wirksamen Abbauprodukten erfasst wird.

### 13. Literatur

- Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen (AFU) (2013):** Spurenstoffe im Abwasser – Suche nach relevanten Emissionsquellen, *Ergebnisse der Messkampagne 2012*.
- Andersen, H. R.; Vinggaard, A. M.; Rasmussen, T. H.; Gjermansen, I. M.; Bonfeld-Jorgensen, E. C. (2002):** Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179: 1-12.
- Andersen, H.; Siegrist, H.; Halling-Sorensen, B.; Ternes, T.A. (2003):** Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37 (18): 4021-4026.
- Ankley, G.; Francis, E.; Gray, E.; Kavlock, R.; McMaster, S.; Reese, D.; Sayles, G.; Sergeant, A.; Vallero, D. (1998):** Research plan for endocrine disruptors. Research Triangle Park, NC, *Office of Research and Development, U.S. EPA*.
- Annck-Hahn, A.; Bornman, M.S.; de Jager, C. (2009):** Oestrogenic activity in drinking waters from rural area in the Waterberg District, Limpopo Province, South Africa. *Water SA.* 35: 245-252
- Arnold, S.F.; Robinson, M.K.; Notides, A.C.; Louis, J.; Guillette, J.; McLachlan, J.A. (1996):** A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Persp.* 104: 544-548.
- Austrian Research Co-operation on Endocrine Modulators (ARCEM). (2003):** Hormonwirksame Stoffe in Österreichs Gewässern – ein Risiko? Ergebnisse aus drei Jahren Forschung. *Forschungsbericht*. Abgerufen am: 16.12.2013, [www.arcem.at](http://www.arcem.at)
- Balaguer, P.; Joyeux, A.; Denison, M.S.; Vincent, R.; Gillesby, B.E.; Zacharewski, T. (1996):** Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using *in vitro* recombinant receptor-reporter gene assays. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 216-222.
- Baronti, C.; Curini, R.; D' Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Samperi, R. (2000):** Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 34 (24): 5059-5066.
- Behr, M.; Oehlmann, J.; Wagner, M. (2011):** Estrogens in the daily diet: *In vitro* analysis indicates that estrogenic activity is omnipresent in foodstuff and infant formula. *Food Chem. Toxicol.* 49 (10): 2681-2688
- W.P. (1999):** Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci. Tot. Environ.* 225: 101-108.
- Beresford, N.; Routledge, E.J.; Harris, C.A.; Sumpter, J.P. (2000):** Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162: 22-33.
- Bergmann, A.; Fohrmann, R.; Weber, F.-A. (2011):** Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Gutachten des IWW Rheinisch-Westfälisches Institut

für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH im Auftrag des Umweltbundesamt, Berlin, *UBA-Texte 66/2011*, Forschungskennzahl 360 14 013, UBA-FB 001525, abgerufen am: 16.12.2013,

<http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4188.pdf>

- Blackburn, M.A.; Waldock, M.J. (1995):** Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* 29: 1623-1629.
- Bovee, T. F.; Helsdingen, R. J.; Rietjens, I. M.; Keijer, J.; Hoogenboom, R. L. (2004):** Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors alpha and beta, and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91 (3): 99-109
- Braga, O.; Smythe, G. A.; Schäfer, A. I.; Feitz, A. J. (2005):** Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Techn.* 39 (9): 3351-3358
- Brand, W.; de Jongh, C.M.; van der Linden, S.C.; Mennes, W.; Puijker, L.M.; van Leeuwen, C.J.; van Wezel, A.P.; Schriks, M.; Heringa, M.B. (2013):** Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environ. Int.* 55: 109-118
- Brinkmann, M.; Maletz, S.; Krauss, M.; Bluhm, K.; Schiwy, S.; Kuckelkorn, J.; Tiehm, A.; Brack, W.; Hollert, H. (2014):** Heterocyclic aromatic hydrocarbons show estrogenic activity upon metabolism in a recombinant transactivation assay. *Manuscript*.
- Brouwer, A. (1998):** Structure-dependent multiple interactions of polyhalogenated aromatic hydrocarbons with the thyroid hormone system. *Organohal. Comp.* 37: 225-228.
- Brüschweiler, B.; Kunz, P. (2011):** Hormonaktive Substanzen in abgepacktem Mineralwasser? *Bundesamt für Gesundheit (BAG) Bulletin* 14: 311-317
- BMLV (Bundesministerium für Ernährung). (2011):** Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), *Pressemitteilung Nr. 042 vom 11.02.11*
- Bursch, W.; Schulte-Hermann, R. (1998):** Toxikologische Bewertung des Vorkommens hormonell wirksamer Chemikalien in der Umwelt. *Wiener Mitteilungen* 153: 119-129.
- Buschini, A.; Giordani, F.; Pellacani, C.; Ross, C.; Poli, P. (2008):** Cytotoxic and genotoxic potential of drinking water: A comparison between two different concentration methods. *Wat. Res.* 42: 199-2006.
- Cathurn, S.; Sabik, H. (2001):** Determination of steroids and coprostanol in surface water, effluent and mussel using chromatography-mass spectrometry. *Chromatogr.* 53 (1): 394-399.
- Chimchirian, R.F.; Suri, R.P.S.; Fu, H. (2007):** Free Synthetic and Natural Estrogen Hormones in Influent and Effluent of Three Municipal Wastewater Treatment Plants. *Water Environ Res.* 79(9): 969-974

- Citulski, J. A.; Farahbakhsh, K (2010):** Fate of endocrine-active compounds during municipal biosolids treatment: a review. *Environ. Sci. Technol.* 44 (22): 8367-8376
- Cadwell, D.J.; Mastrocco, F.; Anderson, P.D.; Länge, R.; Sumpter, J.P. (2012):** Predicted no effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Tox. Chem.* 31 (6): 1396-1406
- Coldham, N.G.; Dave, M.; Sivapathasundaram, S.; McDonnell, D.P.; Connor, C.; Sauerl, M.J. (1997):** Evaluation of a Recombinant Yeast Cell Estrogen Screening Assay. *Environ. Health Persp.* 105 (7)
- Coleman, H. M.; Khan, S. J.; Watkins, G.; Stuetz, R. M. (2008):** Fate and analysis of endocrine disrupting chemicals in some sewage treatment plants in Australia. *Water Sci. Technol.* 58 (11): 2187-2194
- Combalbert, S. (2010):** Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1671-1692
- Courant, F.; Antignac, J.-P.; Maume, D.; Monteau, F.; Andre, F.; le Bizec, B. (2007):** Determination of naturally occurring estrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Addit Contam.* 24 (12): 1358-1366
- Czajka, C.P.; Londry, K.T. (2006):** Anaerobic biotransformation of estrogens. *Sci. Tot. Environ.* 367: 932-941
- D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Mancini, R.; Mastropasqua, R.; Nazzari, M.; Saperi, R. (2003):** Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Tot. Environ.* 302: 199-209.
- Daignault, S.A.; Noot, D.K.; Williams, D.T.; Huck, P.M. (1988):** A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water. *Wat. Res.* 22(7): 803-813.
- De Voogt, P.; De Beer, K., Van der Wielen, F. (1997):** Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 16, 584-595.
- Desbrow, C.; Routledge, E.J.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Waldock, M. (1998):** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32 (11): 1549–1558.
- Di Corcia, A.; Saperi, R.; Marcomoni, A. (1994):** Monitoring aromatic surfactant and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 28: 850-858.
- DIN - Deutsches Institut für Normung e. V. (2009):** Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (DIN EN ISO 11348-1:2007); *Deutsche Fassung EN ISO 11348-1:2008*

- Dutka, B.J.; Jova, A.; Brechin, J. (1981):** Evaluation of four concentration/extraction procedures on waters and effluents collected for use with the Salmonella typhimurium screening procedure for mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 758-764.
- Deutscher Verein des Gas- und Wasserfachs (DVGW) (2008):** Hinweis W 1001: Sicherheit in der Trinkwasserversorgung – Risikomanagement im Normalbetrieb. Technische Mitteilung. *DVGW, Bonn*
- Escher, B.; Vermeirssen, E. (2008a):** Mikroverunreinigungen in Schweizerischen Fließgewässern: Konzepte zur Beurteilung von Mischungen und Einbezug von Mischungen in die Ableitung von toxikologisch begründeten Qualitätskriterien für östrogenartig wirkende Stoffe. Schlussbericht zuhanden des BAFU, *Strategie MicroPoll, Eawag, Dübendorf, Schweiz*
- Escher, B.; Vermeirssen, E. (2008b):** Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. *J. Environ. Monit.*, 2008, 10, 622–631
- Europäische Kommission (2000):** Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption - preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Letzte Änderung: 03.10.2013, abgerufen am: 16.12.2013, [http://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh\\_main.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh_main.pdf)
- Europäische Kommission (2002):** Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions. Letzte Änderung: 03.10.2013, abgerufen am: 16.12.2013, [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/wrc\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/wrc_report.pdf)
- Europäische Kommission (2003):** Technical Guidance Document on risk assessment, Directive 93/67/EEC, part II, 2nd ed, abgerufen am: 16.12.2013, [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_activities/public-health/risk\\_assessment\\_of\\_Biocides/doc/tgd/tgdpart2\\_2ed.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf)
- Europäische Kommission (2008):** RICHTLINIE 2008/105/EG des europäischen Parlamentes und des Rates vom 16. Dezember 2008, Letzte Änderung: 08.07.2013, abgerufen am: 16.12.2013 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:DE:PDF>
- Europäische Kommission (2011):** Endocrine Disrupters Website - How the European Commission uses the precautionary principle to tackle endocrine disruptors. Letzte Änderung: 18.08.2011, abgerufen am 04.11.2011, [http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.htm)  
[http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/index_en.htm)
- Europäische Kommission (2012):** Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. COM(2011) 876 final, Letzte Änderung: 08.07.2013, abgerufen am 16.12.2013, [http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pdf/com\\_2011\\_876.pdf](http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pdf/com_2011_876.pdf)



- Fang, H.; Tong, W. D.; Perkins, R.; Soto, A. M.; Prectl, N. V.; Sheehan, D. M. (2000):** Quantitative comparison of *in vitro* assays for estrogenic activities. *Environ. Health Persp.* 108 (8): 723- 729
- Fent, K. (2007),** Ökotoxikologie. 2. Aufl.: Thieme, Stuttgart
- Frische, T.; Faust M.; Meyer W.; Backhaus, T. (2009):** Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pol. Res.* 16(5): 593-603
- Fritsche, S.; Steinhart, H. (1999):** Occurrence of hormonally active compounds review. *Europ. Food Res. Technol.* 209:153-179.
- Fürhacker, M.; Scharf, S.; Weber, H. (2000):** Bisphenol A: Emissions from point sources. *Chemosph.* 41: 751-756.
- Gehring, M.; Tennhardt, L.; Vogel, D.; Weltin, D.; Bilitewski, B. (2003):** Elimination of Estrogenic Endocrine Disruptors from Laboratory-Derived Sewage Sludge by Means of Simultaneous Aerobic Sludge Stabilisation. In: Pullammanappallil, Pr., McComb, A., Diaz, L. F., Bidlingmaier, W. (eds.): *Proc. 4 th Int. Conference ORBIT Ass. on Biol. Process. Organics: Adv. Sustain. Soc.*, April 30 - May 02, 2003, Perth, Australia, vol. 2, 553 - 562.
- Ghijzen, R.T.; Hoogenboezem, W. (2000):** Endocrine disrupting compounds in the Rhine and Meuse basin – Occurrence in surface , process and drinking water. *Association of river Waterworks (RIWA), Amsterdam*
- Gillesby, B.; Stanostefano, M.; Porter, W.; Safe, S.; Wu, Z.F.; Zacharewski, T. (1997):** Identification of an inhibitory dioxin-like response element (iDRE) required for TCDD-mediated suppression of pS2 expression. *Biochemistr.* 36: 6080-6089.
- Gillesby, B.E.; Zacharewski, T.R. (1998):** Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1): 3-14.
- Gonsior, S.J.; Bailey, R.E.; Rhinehart, W.L.; Spence, M.W. (1984):** Biodegradation of o-phenylphenol in river water and activated sludge. *J. Agric. Food Chem.* 32 (3): 593–596
- Gorski, J.; Raker, B. (1974):** Estrogen action in the uterus: The requisite for sustained estrogen binding in the nucleus. *Gynecol. Oncol.* 2: 249–258.
- Guillette, L.J.J.; Gross, T.S.; Masson, G.R.; Matter, M.M.; Percival, H.F.; Woodward, A.R. (1994):** Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Persp.* 102: 680-688.
- Guillette, L.J.J.; Crain, D.A.; Rooney, A.A.; Pickford, D.B. (1995):** Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health. Perspect.* 103 (7): 157-164.
- Gujer, W. (2002):** Siedlungswasserwirtschaft. *Springer (Berlin)* 2. Auflage

- GWRC (2008):** Tools to detect estrogenicity in environmental waters – Final report. Global Water Research Coalition (GWRC)/Water Environment Research Foundation (WERF) report. 74pp.
- Harries, J.E.; Sheahan, D.A.; Jobling, S.; Matthiesen, J.P.; Neall, P.; Sumpter, J.P.; Taylor, T.; Zaman, N. (1997):** Estrogenic activity in five UK rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 534-542.
- Harries, J.E.; Jambakhsh, A.; Jobling, S.; Matthiesen, J.P., Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. (1999):** Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 932-937
- Hartmann, S.; Lacorn, M.; Steinhart, H. (1998):** Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 62 (1): 7-20
- Heberer, T.; Stan, H.-J. (1997):** Detection of more than 50 substituted phenols as their t-butyltrimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 341: 21-34.
- Heemken, O.P.; Reincke, H.; Stachel, B.; Theobald, N. (2001):** The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosph.* 45: 245-259.
- Hepell, S.A.; Denslow, N.D.; Folmar, L.C.; Sullivan, C.V. (1995):** Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health. Perspect.* 103 (7): 9-15.
- Hintemann, T. (2006):** Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 $\beta$ -Östradiol im Wasserkreislauf. *Dissertation an der Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn*
- Höhne, C.; Püttmann, W. (2008):** Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res.* 15: 405–416
- Holtey-Weber R. (2000):** Zur gesundheitlichen Relevanz von Xenoestrogenen in Wasser und in Lebensmitteln. *GIT Labor-Fachzeitschrift.* 9:1030-1031.
- Huggett, D.B.; Foran, C.M.; Brooks, B.W.; Weston, J.; Peterson, B.; Marsh, K.E.; La Point, T.W.; Schlenk, D. (2003):** Comparison of *in vitro* and *in vivo* bioassays for estrogenicity in effluent from North American municipal wastewater facilities. *Tox. Sci.* 72: 77-83.
- Ike, M.; Jin, C. S.; Fujita, M. (2000):** Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Sci. and Techn.* 42 (7-8): 31–38
- Irwin, L.K.; Gray, S.L.; Oberdorster, E. (2001):** Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquat Toxicol.* 55: 49-60.
- Ivanov, V.; Lim, J. J.-W.; Stabnikova, O.; Gin, Y.-H. (2010):** Biodegradation of estrogens by facultative anaerobic iron-reducing bacteria. *Process Biochem.* 45 (2): 284-287

- Jiang, W.W.; Yan, Y.; Ma, M.; Wang, D.H.; Luo, Q.; Wang, Z.J. (2012):** Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. *Environ. Sci.* 24
- Jiao, B.; Yeung, E.K.C.; Chan, C.B.; Cheng, C.H.K. (2008):** Establishment of a Transgenic Yeast Screening System for Estrogenicity and Identification of the Anti-Estrogenic Activity of Malachite Green. *J. Cell Biochem.* 105: 1399-1409
- Jin, S.; Yang, F.; Liao, T.; Hui, Y.; Xu, Y. (2008):** Seasonal variations of estrogenic compounds and their estrogenicities in influent and effluent from municipal sewage treatment plant in China. *Environ. Tox. Chem.* 27 (1): 146-153
- Jobling, S.; Sumpter, J.P. (1993):** Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27: 361-372
- Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. (1995):** A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Persp.* 103: 582-587.
- Johnson, A.C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A. (2000):** Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256: 163-173.
- Johnson, A.C.; Williams, R.J. (2004):** A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 38(13): 3649-3658.
- Joss, A.; Andersen, H.; Ternes, T.; Richle, P.R.; Siegrist, H. (2004):** Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environ. Sci. Technol.* 38: 3047-3055.
- Junk, G.A.; Richard, J.J.; Griser, M.D.; Witiak, D.; Witiak, J.L.; Arguello, M.D.; Vick, R.; Svec, H.J.; Fritz, J.S.; Calder, G.V. (1974):** Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. *J. Chromatogr.* 99: 745-762.
- Jürgens, M.; Johnson, A.C.; Jekel, M. (1998):** Das Verhalten von Steroidestrogenen in Flüssen. 3. deutschsprachige SETAC-Europe-Tagung: Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Zittau 18./19.3.1998. *Tagungsprogramm und Abstracts*, S. 103.
- Kaiser, C.E. (2001):** Etablierung eines auf Hefezellen basierenden Assays zur Erfassung estrogenen Wirkungen im Rahmen der Umwelt-, Nahrungs- und Futtermittelanalytik. *Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-moritz-Arndt-Universität Greifswald*
- Kalbfus, W. (1998):** Hormonaktive Substanzen in (bayerischen) Gewässern - Herkunft und Gefährdungspotenzial. In: *GSF-Bericht* 16/98: 25-30.
- Kang, J-H.; Katayama, Y.; Kondo, F. (2006):** Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Tox.* 217 (2-3): 81-90

- Kang, J.; Price, W.E. (2009):** Occurrence of phytoestrogens in municipal wastewater and surface waters. *Environ. Monit.* 11: 1477-1483
- Kavlock, R.J.; Daston, G.P.; Derosa, C.; Fenner-Crisp, P.; Gray, L.E.; Kaattari, S.; Lucier, G.; Luster, M.; Mac, M.J.; Maczka, C.; Miller, R.; Moore, J.; Rolland, R.; Scott, G.; Sheehan, D.M.; Sinks, T.; Tilson, H.A. (1996):** Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Persp.* 104 (4): S. 715-740
- Kennedy, K.; Macova, M.; Leusch, F.; Bartkow, M.E.; Hawker, D.W.; Zhao, B.; Denison, M. (2009):** Assessing indoor air exposures using passive sampling with bioanalytical methods for estrogenicity and aryl hydrocarbon receptor activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (5): 1413-1421
- Kienle, C.; Kunz, P.; Vermeirssen, E.; Homazava, N.; Werner, I. (2012):** Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließgewässern. Studie im Auftrag des BAFU. *Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie*, Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Klaus, C.; Metzger, J.W. (2008):** Hormone im Abwasser: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Elimination von estrogen aktiven Substanzen während der Kläranlagenpassage mit dem E-Screen-Assay. *Korrespondenz Abwasser, Abfall* 55 (8): 865-871
- Kloas, W.; Lutz, I.; Einspanier, R. (1999):** Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Total. Environ.* 225 (1-2): 59-68.
- Kloas, W.; Schrag, B.; Ehnes, C.; Segner, H. (2000):** Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 287-299.
- Klotz, D.M.; Beckman, B.S.; Hill, S.M.; McLachlan, J.A.; Walters, M.R.; Arnold, S.F. (1996):** Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. *Environ. Health. Persp.* 104: 1084 - 1089.
- Körner, W.; Hanf, V.; Schuller, W.; Bartsch, H.; Zwirner, M.; Hagenmaier, H. (1998):** Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosph.* 37: 2395-2407.
- Körner, W.; Spengler, P.; Bolz, U.; Hagenmaier, H.; Metzger, J. (1999):** Monitoring of estrogenic substances in sewage plant effluents by biological and chemical analysis. *Organohal. Comp.* 42: 29-32.
- Körner, W.; Bolz, U.; Süßmuth, W.; Hiller, G.; Schuller, W.; Hanf, V.; Hagenmaier, H. (2000):** Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosph.* 40 (9-11): 1131-1142

- Körner, W.; Spengler, P.; Bolz, U.; Schuller, W.; Hanf, V.; Metzger, J. W. (2001):** Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environ. Tox. Chem.* 20 (10): 2142-2151.
- Kortenkamp, A. (2007):** Ten years of mixing cocktails — a review of endocrine disrupter mixture effects. *Environ. Health Perspect.* 114: 752–758
- Krein, A.; Pailler, J.-Y.; Guignard, C.; Gutleb, A.; Hoffman, L.; Meyer, B.; Keßler, S.; Berckmans, P.; Witters, H.E. (2012):** Determination of Estrogen Activity in River Waters and Wastewater in Luxembourg by Chemical Analysis and the Yeast Estrogen Screen. *Environment and Pollution.* 1 (2)
- Kuiper, G.G.J.M.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Eenmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.-A. (1997):** Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrin.* 138 (3): 863-870
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G.; Carlsson, B.; Corton, J.C.; Safe, S.H.; Saag, P.T.; Burg, B.; Gustafsson, J.-A. (1998):** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinol.* 139: 4252-4263.
- Kunte, H.; Pfeiffer, E.H. (1985):** Isolation of organic material from water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 650-655.
- Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A. (2004):** Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta.* 501: 79–88
- Lange, C.; Kuch, B.; Metzger, J. (2013):** Untersuchung von Mineralwässern auf estrogene Wirkung mittels E-Screen-Assay. *gwf-Wasser/Abwasser.* 9: 982-987
- Larsen, T.A.; Lienert J.; Joss, A.; Siegrist, H. (2004):** How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Biotech.* 113: 295-304
- Lee, H.B.; Peart, T.E. (2000):** Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Qual. Res. J. Can.* 35: 283-298.
- Lee, H.B.; Peart, T.E.; Svoboda, M.L. (2005):** Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1094: 122-129.
- Leisewitz, A.; Schwarz, W. (1997):** Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A; Dibutylphthalat / Benzylbutylphthalat; Nonylphenol / Alkylphenoethoxylate). *Umweltbundesamt (UBA), Berlin, Forschungsbericht 106 01 076, abgerufen am: 16.12.2013*  
<http://www.oekorecherche.de/deutsch/berichte/volltext/vollEndokrin.pdf>
- Leusch, F.D.L.; De Jager, C.; Levi, Y.; Lim, R.; Puijker, L.; Sacher, F.; Tremblay L.A.; Wilson V.S.; Chapman, H.F. (2010):** Comparison of five *in vitro* bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. *Environ. Sci. Techn.* 44 (10): 3853-3860

- Limpiyakorn, T.; Homklin, S.; Ong, S. K. (2011):** Fate of Estrogens and Estrogenic Potentials in Sewerage Systems. *Environ. Sci. Technol.* 41 (13): 1231-1270
- Liu, S.; Liang, L.N.; Suflita, J.M. (1991):** The metabolism of the Ground Water Contaminant 2-Hydroxybiphenyl under Sulfate-Reducing Conditions. *Curr. Microbiol.*, 22: 69–72.
- Liu, Y. (2011):** Biodegradation of bisphenol A, 17 beta estradiol, and 17 alpha ethynylestradiol in river water. *Environ. Poll.* 45 (1-3): 225-236
- Maczka, C.; Pang, S.; Policansky, D.; Wedge, R. (2000):** Evaluating impacts of hormonally active agents in the environment. *Env. Sci. Technol.* 34: 136-140.
- Matthiessen, P.; Gibbs, P.E. (1998):** Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 37- 43.
- Matthiesen, P.; Arnold, D.; Johnson, A.C.; Pepper, T.J.; Pulman, K.G.T. (2006):** Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Sci. Total Environ.* 367: 616-630
- Meerts, I.A.T.M.; Letcher, R.J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J.G.; van der Burg, B.; Brouwer, A. (2001):** *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ. Health Persp.* 109: 399-407.
- Mol, H.G.J.; Sunarto, S.; Steijger, O.M. (2000):** Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert-butyl)dimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatog. A.* 879: 97-112.
- Moltmann, J.F.; Liebig, M.; Knacker, T.; Keller, M.; Scheurer, M.; Ternes, T. (2007):** Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel – Neubewertung des Vorkommens, Erarbeitung eines Monitoringkonzepts sowie Ausarbeitung von Maßnahmen zur Reduzierung des Eintrags in Gewässer. *F+E-Vorhaben im Auftrag des Umweltbundesamtes, Dessau*, FKZ 20524205, Abschlussbericht, abgerufen am: 16.12.2013, <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3324.pdf>
- Mueller, S.O.; Kling, M.; Arifin Firzani, P.; Mecky, A.; Duranti, E.; Shields-Botella, J.; Delansorne, R.; Broschard, T.; Kramer, P.-J. (2003):** Activation of estrogen receptor alpha and beta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: Comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol. Lett.* 142: 89-101.
- Nam, S.-W.; Jo, B.-I.; Yoon, Y.; Zoh, K.-D. (2014):** Occurrence and removal of selected micropollutants in a water treatment plant. *Chem.* 95: 156–165
- Norberg, B.; Haux, C. (1985):** Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmo species: rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B:869-876.

- Odum, J.; Lefevre, P.A. (1997):** The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonylphenols and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25: 176-188.
- Onda, K.; Nakamura, Y.; Takatoh, C.; Miya, A.; Katsu, Y. (2003):** The behaviour of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Wat. Sci. Technol.* 45 (9): 109-116.
- Pawlowski, S.; Ternes, T.; Bonerz, M.; Kluczka, T.; van der Burg, B.; Nau, H.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. (2003):** Combined in Situ and *in vitro* Assessment of the Estrogenic Activity of Sewage and Surface Water Samples. *Toxicol. Sci.* 75: 57–65
- Pawlowski, S.; Ternes, T. A.; Bonerz, M.; Rastall, A. C.; Erdinger, L.; Braunbeck T. (2004):** Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Tox. in Vitro* 18 (1): 129-138
- Petrovic, M.; Diaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D. (2001):** Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and wastewaters by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73: 5886-5895.
- Phenomenex (2012):** Produktdetails zur Strata-x SPE – Kartusche, abgerufen am: 17.12.2012, 15:00 Uhr, <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>
- Pinto, B.; Reali, D. (2009):** Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 212: 228-232
- Planas, C.; Guadayol, J.M.; Droguet, M.; Escalas, A.; Rivera, J.; Caixach, J. (2002):** Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Wat. Res.* 36: 982-988.
- Plotan, M.; Frizzell, C.; Robinson, V.; Elliott, C.T.; Connolly, L. (2013):** Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. *Food. Chem.* 136 (3-4): 1590-1596
- Purdum, C.E.; Hardiman, P.A.; Bye, V.J.; Eno, N.V.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. (1994):** Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8: 275.
- Rinken, M.J. (2002):** Gas chromatographic-mass spectrometric determination of bisphenol A in water at nanogram per litre concentrations. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 82 (2): 77-85.
- Routledge, E.J.; Sumpter, J.P. (1996):** Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (3): 241-248.
- Rudel, R.A.; Melly, S.J.; Geno, P.W.; Sun, G.; Brody, J.G. (1998):** Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, sewage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* 32: 861-869.
- Safe, S.H. (1997):** Xenoestrogens and breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 337: 1303-1304.

- Sakamoto, H.; Ohe, T.; Hayatsu, T.; Hayatsu, H. (1996):** Evaluation of blue-chitin column, blue-rayon hanging, and CAD-resin column techniques for concentration mutagens from two Japanese rivers. *Mutat. Res.* 371: 73-85.
- Sanseverino, J.; Eldridge, M. E.; Layton, A. C.; Schultz, T. W. (2009):** Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. *Tox. Sci.* 107 (1): 122-134
- Sarmah, A.K.; Northcott, G.I.; Leusch, F.D.I.; Tremblay, L.A. (2006):** A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Sci. Total Environ.* 355: 135-144
- Schilirò, T., Gorrasi, I.; Longo, A.; Coluccia, S.; Gilli, G. (2001):** Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 127 (1-2): 139-146
- Schlumpf, M.; Lichtensteiger, W. (2002):** In: Hormonaktive Chemikalien. *Verlag Hans Huber, Bern*
- Schmidt, R.; Brockmeyer, R. (2000):** Arzneimittel in der Umwelt. *Schriftenr. Ver. Wasser Boden Lufthyg.* 106: 49-58.
- Schmidt, N.; Zawadsky, C.; Tiehm, A. (2012):** Deliverables No. 311/315 and 317/503: Identification of biodegradation processes (D311) and assessment of water quality during soil infiltration, aquifer storage and recharge (D315). Water quality analysis in waste water and recharged groundwater (D317) and Assessment of groundwater risk by treated waste water (D503). *SMART Sustainable Management of Available Water Resources with Innovative Technologies – IWRM Integrated Water Resources Management in the Lower Jordan Rift Valley.* BMBF IWRM R&D Program
- Schrenk-Bergt, C.; Steinberg, C. (1999):** Endokrine Substanzen – Bedeutung und Wirkmechanismen. In: Oelmann, J.; Markert, B., *Ökotoxikologie.*
- Schultis, T.; Metzger, J.W. (2003):** Endokrine Aktivität verschiedener Bisphenole und deren Derivate BADGE und BFDGE. *8. Jahrestagung der SETAC-GLB*, 21.-23. Sept. 2003, Heidelberg
- Schultis, T.; Metzger J. W. (2004):** Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosph.* 57: 1649-1655
- Schultis, T. (2005):** Erfassung der estrogenen Wirksamkeit von Umweltproben und Reinsubstanzen durch biologische Testsysteme - Entwicklung und Vergleich von *in vitro* Assays. *UWSF* 17: 125.
- SVGW (Schweizer Verein des Gas- und Wasserfachs) – Société Suisse de l'Industrie du Gaz et des eaux (SSIGE) (2003):** "Spurenstoffe im Trinkwasser": Tipps zur Kommunikation – Ein Leitfaden für Wasserversorgungen. *SVGW/SSIGE*
- Servos, M.R.; Bennie, D.T.; Burnison, B.K.; Jurkovic, A.; Mc Innis, R.; Neheli, T.; Schnell, A.; Seto, P.; Smyth, S.A.; Ternes, T. (2005):** Distribution of estrogens, 17- $\beta$ -estradiol and estrone in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 336: 155-170.



- Sharpe, R.M.; Skakkebaek, N.E. (1993):** Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 341: 1392-1395.
- Sheahan, D.A.; Bucke, D.; Matthiessen, P.; Sumpter, J.P.; Kirby, M.F.; Neall, P.; Waldock, M. (1994):** The effects of low levels of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, held at two acclimation temperatures. In: Müller, R., Lloyd, R. Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish., p.99-112, *Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford*.
- Shelby, M.; Newbold, R.R.; Tully, D.B.; Chae, K.; Davis, V.L. (1996):** Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environ. Health Persp.* 104: 1296-1300.
- Shin, H.S.; Park, S.H.; Park, S.J.; Pyo, H. (2001):** Sensitive determination of bisphenol A in environmental water by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection after cyanomethylation. *J. Chromatogr. A*. 912: 119-125.
- Shue, M.-F.; Chen, F.-A.; Kuo, K.-T.; Chen, T.-C. (2009):** Nonylphenol concentration and estrogenic activity in Kaoping River and its tributaries, Taiwan. *Water Science & Technology—WST*. 59 (10): 2055–2063
- Smeets, J.M.; Rankouhi, T.R.; Nichols, K.M.; Kamen, H.; Kaminski, N.E.; Giesy, J.P.; van der Berg, M. (1999):** *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activities by xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157(1): 68-76.
- Snyder, S.A.; Keith, T.L.; Verbrugge, D.A.; Snyder, E.M.; Gross, T.S.; Kannan, K.; Giesy, J.P. (1999):** Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2814-2820.
- Snyder, S.A.; Trenholm, R.A.; Snyder, E.M.; Bruce, G.M.; Pleus, R.C.; Hemming, J.D.C. (2008):** Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Drinking Water. *AWWA American Water Works Association) Research Foundation*
- Soto, A.M.; Sonnenschein, C.; Chung, K.L.; Serrano, M.F.; Olea, N.; Fernandez, M.F. (1995):** The E-Sreen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ.Health Persp.* 103: 113-122.
- Spengler, P. (2001):** Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser. *Dissertation von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart*.
- Stanford, B.D.; Snyder, S.A.; Trenholm, R.A.; Holady, J.C.; Vanderford, B.J. (2010):** Estrogenic activity of US drinking waters: A relative exposure comparison. *American Water Works Association (AWWA)*. 102 (11): 55-65

- Staples, C.A.; Dorn, P.B.; Klecka, G.M.; O'Block, S.T.; Bransone, D.R.; Harris, L.R. (2000):** Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosph.* 40: 521-525
- Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; Baumann, W. (1996):** Nachweis von natürlichen und synthetischen Estrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 87: 251-251.
- Tennhardt, L. (2004):** Potenzial technischer Abwasser- und Klärschlammbehandlungsverfahren zur Elimination endokrin aktiver Substanzen. *Dissertation an der Technischen Universität Dresden.*
- Ternes, T.A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Haberer, K.; Wilken, R.-D.; Servos, M. (1999a):** Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total. Environ.* 225: 81-90.
- Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999b):** Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total. Environ.* 225: 91-99.
- Ternes, T.A.; Joss, A. (2006):** Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management. *IWA Publishing, London, ISBN 1843390930*
- Toppari, J.; Larsen, J.C.; Christiansen, P.; Giwercman, A.; Grandjean, P.; Guillette, L.J.; Jegou, B.; Jensen, T.K.; Jouannet, P.; Keiding, N.; Leffers, H.; McLachlan, J.A.; Meyer, O.; Müller, J.; Rajpert-De Meyers, E.; Scheike, T.; Scharpe, R.; Sumpter, J.; Skakkebaek, N.E. (1996):** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Persp.* 104 (4): 741.
- Tremblay, L.; van der Kraak, G. (1999):** Comparison between the effects of the phytosterol beta-sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 329-336.
- Tyler, C.R.; Jobling, S.; Sumpter, J.P. (1998):** Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (4): 319-361.
- Vader, J.S.; Ginkler, C.G.; Sperling, F.M.G.M.; de Jong, J.; de Boer, W.; de Graaf, J.S.; van der Most, M.; Stokman, P.G.W. (2000):** Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosph.* 41: 1239-1243
- Vermeirssen, A.L.M.; Burki, R.; Joris, C.; Peter, A.; Gegner, H.; Suter, M.J.-E.; Burkhardt-Holm, P. (2005):** Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (9): 2226-2233
- Vethaak, A.D.; Lahr, J.; Schrap, S.M.; Belfroid, A.C.; Rijs, G.B.J., Gerritsen, A.; de Boer, J.; Bulder, A.S.; Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V.; Legler, J.; Murk, T.A.J.; Peijnenburg, W.;**

- Verhaar, H.J.M., de Voogt, P. (2005):** An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosph.* 59: 511-524
- Voordeckers, J. (2002):** Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in Estuarine Sediments. *Environ. Sci. Techn.* 36: 696-701
- Wagner, M.; Oehlmann, M. (2009):** Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (3): 278-286
- Wagner, M.; Oehlmann, M. (2011a):** Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127: 128-135
- Wagner, M.; Oehlmann, M. (20011b):** Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen. *Im Auftrag des Umweltbundesamt (UBA)*. UBA-FB 001482
- Wahlberg, C.; Renberg, L.; Wideqvist, U. (1990):** Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. *Chemosph.* 20: 179-195.
- Wahli, W.; Dawid, I.B.; Ryffel, G.U.; Weber, R. (1981):** Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298-304.
- Wegener, G.; Persin, J.; Karrenbrock, F.; Rörden, O.; Hübner, I. (1999):** Presence and behaviour of natural and synthetic estrogens and their conjugates in the aquatic environment. *Vom Wasser* 92: 347-360.
- Wenzel, A.; Küchler, T.; Henschel, K.-P.; W.S.-P.; Diedrich, M.; Müller, J. (1998):** Konzentration estrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien. *Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit: Umweltchemikalien/Schadstoffwirkungen: Forschungsbericht 216 02 011/11.*
- Witters, H.E.; Vangenechten, C.; Berckmans, P. (2001):** Detection of estrogenic activity in Flemish surface waters using an *in vitro* recombinant assay with yeast cells. *Wat. Sci. Technol.* 43: 117-123.
- Wolff, M.S.; Toniolo, P.G.; Lee, E.W.; Rivera, M.; Dublin, N. (1993):** Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 648-652.
- Wölz, J.; Grosshans, K.; Streck, G.; Schulze, T.; Rastall, A.; Erdinger, L.; Brack, W.; Fleig, M.; Kühlers, D.; Braunbeck, T.; Hollert, H. (2011):** Estrogen receptor mediated activity in bankside groundwater, with flood suspended particulate matter and floodplain soil - an approach combining tracer substance, bioassay and target analysis. *Chemosph.* 85 (5): 717-723
- Xu, N. (2009):** Estrogen concentration affects its biodegradation rate in activated sludge. *Environ. Toxic. Chem.* 28 (11): 2263-2270

- Yi, T.; Harper, W.F.Jr. (2007):** The link between nitrification and biotransformation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 41 (12): 4311-4316
- Ying, G-G.; Kookana, R.S.; Dillon, P. (2003):** Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* 37: 3785–3791
- Young, W.F.; Whitehouse, P.; Johnson, I.; Sorokin, N. (2004):** Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters. *Environmental Agency. R&D Technical Report P2-T04/1*
- Zacharewski, T.; Berhane, K.; Gillesby, B.; Burnison, B.K. (1995):** Evidence for the presence of estrogen receptor and Ah receptor ligands in pulp and paper mill black liquor. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2140-2146.
- Zeng, Q. (2009):** Nitrate-dependent degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by acclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Chem. Techn. Biotechnol.* 84: 1841-1847
- Zhang, Z.; jia, C.; Hu, Y.; Sun, L.; Jiao, J.; Zhao, L.; Zhu, D.; Li, J.; Tian, Y.; Bai, H.; Li, R.; Hu, j. (2012):** The estrogenic potential of salicylate esters and their possible risks in foods and cosmetics. *Toxicology Letters* 209 (2): 146–153
- Zhang, Z.; Ren, N.; Kannan, K.; Nan, J.; Liu, L.; Ma, W.; Qi, H.; Li, Y. (2014):** Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China. *Arch Environ Contam Toxicol.*
- Zou, E.; Fingerman, M. (1999):** Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-tert.-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab. *Uca pugilator. Comp. Biochem. Physiol.* 122C:115-120.