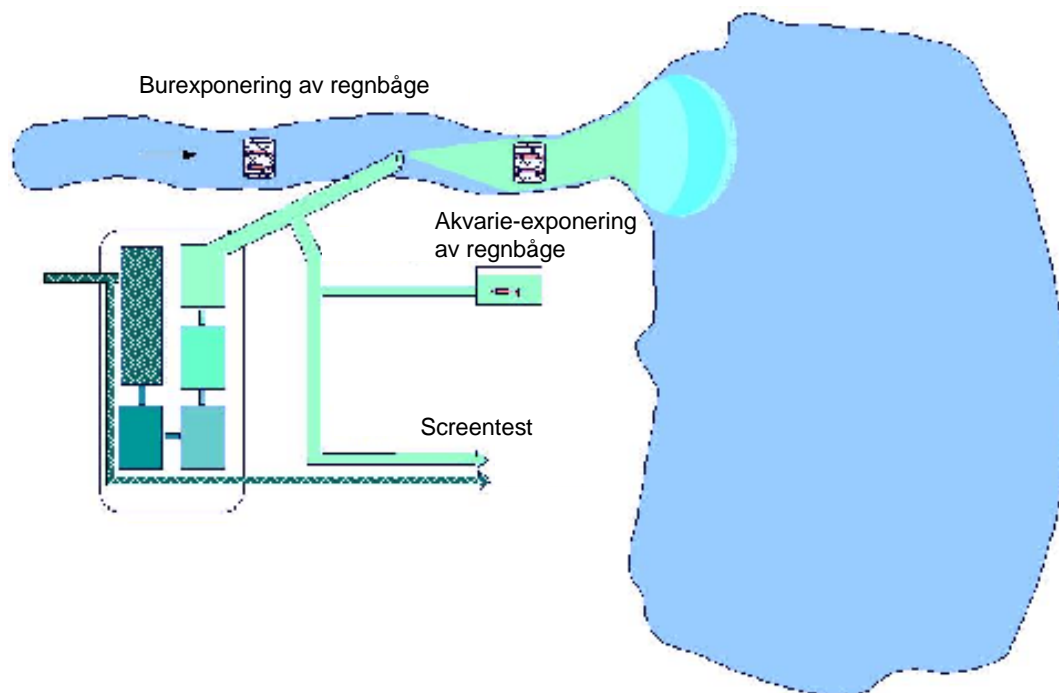




rapport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Östrogena effekter av kommunala och industriella avloppsvatten i Sverige



Anders Svenson, Ann-Sofie Allard, Tomas Viktor, Stefan Örn, Jari Parkkonen,
Lars Förlin och Leif Norrgren
B 1352
Stockholm, 2000

IVL

Organisation/Organization IVL Svenska Miljöinstitutet AB	RAPPORTSAMMANFATTNING Report Summary
Adress/address Box 21060 100 31 STOCKHOLM	Projekttitel/Project title Nationell översikt av östrogena effekter i avloppsvatten från reningsverk och industrier på fisk
Telefonnr/Telephone 08-59859300	Anslagsgivare för projektet/Project sponsor SSVL, SIVL, VA-Forsk, EU, Kemira Kemi AB, enskilda kommuner och företag
Rapportförfattare/author Anders Svenson, Ann-Sofie Allard, Tomas Viktor, Stefan Örn, Jari Parkkonen, Lars Förllin och Leif Norrgren	
Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report Östrogena effekter av kommunala och industriella avloppsvatten i Sverige.	
Sammanfattning/Summary Östrogena effekter har undersökts i 18 kommunala reningsverk med varierande metoder för rening och tolv industriutsläpp. Kommunala avloppsvatten innehåller ämnen med östrogena effekter. Uppmätta effekter i utgående, behandlade avloppsvatten motsvarade <0,1 – 15 ng östradiolekvivalenter per liter vid mätningar i ett screentest. Halter i inkommande, obehandlat avloppsvatten var mestadels högre, men i några fall var halterna i samma nivå före och efter reningsverken och i två fall noterades en ökning i utgående vatten. Biologisk behandling har avgörande betydelse för att minska östrogena effekter i kommunala avlopp. Anläggningar med enbart kemisk fällning återfanns bland dem som hade samma nivå i inkommande och utgående avloppsvatten. De anläggningar som uppvisade lägst nivåer i utgående vatten, under detektionsgränsen i testet, 0,1 ng/l, hade även behandling för kvävereduktion. I industriella avloppsvatten kunde en östrogen effekt påvisas i tre fall av tolv undersökta industrier. I två av dessa tre leddes avloppsvattnet genom kommunala reningsverk. Sannolikt bidrog det kommunala avloppsvattnet med huvuddelen av effekten i dessa anläggningar. Inga östrogena effekter erhöles vid exponering av regnbåge i recipienter till kommunala och industriella avloppsvatten. Vid exponering för outspätt avloppsvatten, i akvarier, påvisades östrogena effekter i fyra av åtta undersökta kommunala anläggningar, samt i de två undersökta kombinerade textila och kommunala avloppsvattnen.	
Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område, näringsgren eller vattendrag/Keywords Hormoneffekt, östrogen, fisk, vitellogenin, avloppsvatten, Sverige	
Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data IVL Rapport/report B 1352	
Beställningsadress för rapporten/Ordering address IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm fax: 08-59356390, e-mail: publicationservice@ivl.se	

Innehållsförteckning

Sammanfattning	2
Summary	3
1 Inledning, bakgrund	4
2 Material och metoder	5
2.1 Östrogentest med modifierade jästceller.....	5
2.1.1 Vattenprovtagning, upparbetning.....	5
2.1.2 Utförande	5
2.2 Fiskförsök	6
2.2.1 Burexponering.....	6
2.2.2 Akvarieexponering.....	7
2.2.3 Fiskprovtagning	8
2.2.4 Analys av vitellogenin	8
3 Resultat och diskussion	8
3.1 Undersökta reningsverk och industrier	8
3.4 Screen-test	10
3.4.1 Östrogen effekt i inkommande kommunala avloppsvatten	10
3.4.2 Östrogen effekt i behandlade, utgående kommunala och industriella avloppsvatten	10
3.4.3 Retention av östrogena effekter i kommunala reningsverk	11
3.5 Östrogena effekter på fisk.....	13
3.5.1 Induktion av vitellogeninbildning	13
4 Slutsatser.....	16
5 Tillkännagivanden.....	16
6 Referenser	16

Bilaga 1. Tabeller

Bilaga 2. Diagram

Sammanfattning

Tidigare undersökningar främst från Storbritannien har visat att kommunala avloppsvatten innehåller ämnen som kan påverka fisk i utsläppsmiljöer. Utvecklingen av hanfiskar påverkades med störningar i reproduktionen som följd. Man har också sett att östrogener och andra ämnen som av organismer uppfattas som östrogenliknande åstadkommer sådana effekter. Denna undersökning syftar till att dokumentera förekomsten av östrogena effekter i svenska kommunala och industriella avloppsvatten. Undersökningarna baseras dels på provtagning av avloppsvatten och test med en rekombinant jästcell som innehåller gener för en östrogenreceptor, dels utplacering av icke könsrogen regnbåge i recipienter till avloppsvatten, blodprovtagning och mätning av ett guleprotein i fiskblodet. Bildningen av guleproteinet är en process som styrs av östrogener.

Undersökningen omfattade 30 anläggningar, 18 kommunala reningsverk med varierande metoder för rening och tolv industriutsläpp, varav två textilindustriella utsläpp letts genom kommunala reningsverk. Övriga industriutsläpp representerade massaindustri (6), kemiindustri (3) och ett stålverk. Kommunala avloppsvatten innehöll ämnen med östrogena effekter. Uppmätta effekter i utgående, behandlade avloppsvatten motsvarade <math><0,1 - 15\text{ ng östradiolekvivalenter per liter}</math> vid mätningar i jästcelltestet. Halter i inkommande, obehandlat avloppsvatten var mestadels högre. Upp till 31 ng/l uppmättes. I några fall var halterna i samma nivå före och efter reningsverken och i två fall noterades en ökning i utgående vatten. I industriella avloppsvatten kunde en östrogen effekt påvisas i tre fall av tolv undersökta industrier. I två av dessa tre leddes avloppsvattnet genom kommunala reningsverk. Sannolikt bidrog det kommunala avloppsvattnet med huvuddelen av effekten i dessa anläggningar. I det tredje fallet påvisades en effekt motsvarande 0,6 ng per liter i avloppsvatten från en kemisk industri.

Inga östrogena effekter erhöles vid exponering av regnbåge i recipienter till kommunala och industriella avloppsvatten. Vid exponering för utspätt avloppsvatten i akvarier påvisades östrogena effekter däremot i fyra av åtta undersökta kommunala anläggningar, samt i de två undersökta kombinerade textila och kommunala avloppsvattnen. I fyra anläggningar uteblev således också effekter även vid exponering för utspätt avloppsvatten.

Avloppsvatten som saknade effekter i screentest påverkade inte bildningen av vitellogenin i regnbåge. Utsläpp med östrogen effekt i fisktestet hade inte högre effekter i screentest jämfört med de avloppsvatten som inte gav utslag i fisktest.

Biologisk behandling har avgörande betydelse för att minska östrogena effekter i kommunala avlopp. Anläggningar med enbart kemisk fällning återfanns bland dem som hade samma nivå i inkommande och utgående avloppsvatten. De anläggningar som uppvisade lägst nivåer i utgående vatten, under detektionsgränsen i testet, 0,1 ng/l, hade utökad biologisk behandling (för kvävereduktion). Tillsatser av fällningskemikalier i två steg gav större reduktion av östrogena effekter i kommunala avloppsvatten.

Summary

Estrogenic effects on fish have been reported from British waters receiving municipal effluents. Adverse feminization effects on male fish were observed, such as appearance of oocytes in testicular tissues, production of yolk protein precursors and skewed sex ratios in fish populations. This investigation will survey estrogenic effects in Swedish wastewaters. Tests are based on screening water samples using a recombinant yeast cell test and analyses of the yolk protein precursor in blood of juvenile rainbow trout caged in waters close to wastewater outlets.

Totally 30 wastewaters were examined, 18 municipal treatment works and 12 industrial plants. Estrogenic effects were found in municipal effluents. Effects corresponding to <math><0.1 - 15\text{ ng estradiol equivalents}</math> were measured in effluents. Usually higher effects were found in influent water, but in a few cases, the levels in influents and effluents were the same. Two effluents with higher effects than influent water were also found.

In nine of totally 12 investigated industrial effluents the estrogenic effects were below the detection limit of the screen test, 0.1 ng/l. All six investigated pulp and paper industries, a steel work and two chemical industries had no detectable estrogenic effects in their wastewaters. Two industries, that led the wastewater through a municipal treatment work, were tested positive. Probably most of the effect was due to estrogens from domestic wastewater. A wastewater from a chemical industry contained a low level of estrogenic effect corresponding to 0.6 ng estradiol equivalents per litre.

Cage exposed rainbow trout did not respond to exposure in receiving waters to either municipal or industrial effluents. Exposure to undiluted municipal wastewater on the other hand resulted in increased levels of vitellogenin in plasma of juvenile trouts. Obviously concentrations in receiving waters were not high enough to produce this effect. However, four municipal wastewaters and all industrial effluents not mixed with domestic wastewater were negative in tests with exposure in aquaria. Exposed fish also responded in reduced relative liver weights as compared to control fishes.

The two applied tests of estrogenic effects were correlated in the sense that wastewaters containing no effects in the screen test were also negative in the *in vivo* test. Effluents tested positive in the *in vivo* test were also positive in the screen test. However, there was no significant correlation between levels measured in the screen test and the increased vitellogenin contents in plasma.

Biological wastewater treatment was important in reduction of estrogenic effects in municipal treatment plants. Plants with extended chemical precipitation also reduced the effect levels considerably, but when only a single chemical precipitation step was used, the reduction was less.

1 Inledning, bakgrund

Under de senaste åren har allt fler kemikalier identifierats som påverkande på reproduktionsförmågan hos fisk (1). Framförallt handlar det om ämnen som härrar naturligt förekommande hormoner, ersätter dessa och på så sätt påverkar en rad fysiologiska processer. I Storbritannien observerades under 1990-talets början förändringar hos fisk i form av feminisering av hanfiskar nedströms kommunala avloppsreningsverk (1-4). Förändringarna ansågs orsakade av mänskliga hormoner och i någon mån läkemedelsrester. Det har senare visats att dessa ämnen inte bryts ner tillräckligt i reningsprocesserna.

Östrogena steroidhormoner utsöndras i huvudsak via urin och fekalier. Steroiderna har låg vattenlöslighet och för att underlätta utsöndringen från kroppen kopplas den ursprungliga substansen till grupper som ökar vattenlösligheten. Detta innebär också att steroidernas hormonfunktion inaktiveras. I kontakt med mikroorganismer, t. ex. i kloakledningar eller reningsverk, kan steroidkonjugaten avblockeras och den hormonella aktiviteten återfås (5).

Ett antal kemikalier som förekommer inom industri och lantbruk har visat sig ha östrogenliknande egenskaper vilket kan resultera i en feminisering hos ett exponerat djur. Nonylfenol och dess derivat, polyklorerade bifenyler, bifenol-A, klorerade organiska pesticider samt några ftalater är exempel på kemiska ämnen som man idag vet har hormonstörande verkan (1,6,7). Idag har användningen av nonylfenoletoxilater särskilt ifrågasatts och minst 90 % av användningen bör ha upphört till år 2000 enligt riksdagens mål. Förutom syntetiska substanser kan naturligt förekommande ämnen t. ex. ur växtriket ge östrogena effekter (8).

Förekomst av östrogena ämnen kan påvisas med olika metoder. En av de mest använda bygger på modifierade jästceller i vilka genen för mänsklig östrogenreceptor byggts in (6). När dessa celler utsätts för mänskligt östrogen eller ämnen med liknande egenskaper startas en händelsesekvens som möjliggör en kvantifiering av östrogena effekter.

En normal funktion, som östrogen har hos fiskhonor, är att de stimulerar levern att bilda vitellogenin, som utgör en viktig beståndsdel i fiskrom. Vitellogeninens aktivitet av östrogen och uttrycket av genen beror på bindning av östrogen till receptorer i levern. Genen är normalt inte aktiverad hos icke köns mogen fisk eller hanfisk men utsätts de för hormonliknande substanser med en struktur som påminner om det kvinnliga könshormonet östrogen, kan även de börja producera vitellogenin. Närvaron av vitellogenin i blodplasma kan därför användas som indikator på att icke köns mogen fisk eller hanfisk utsätts för östrogen eller östrogenlika substanser (9,10). Man anser även att exponering för hormönhärmande ämnen som inducerar bildande av vitellogenin är meta-

boliskt stressande för fiskar av båda könen. Denna metaboliska stress kan leda till skador på lever och njurar samt att kalk frisätts från fjäll och skelett.

Engelska undersökningar har som ovan nämnts påvisat östrogena effekter i kommunala avloppsvatten. Biologisk behandling var den dominerande metoden för rening av kommunalt avlopp. Sådan reningsmetodik tillämpas även i Sverige, men oftast kombinerad med olika fällningsförfaranden. En tidigare studie av ett svenskt kommunalt avloppsvatten har visat på östrogena effekter i form av vitellogeninbildning i burhållen regnbåge (11).

Målet med detta projekt är att undersöka effekter av östrogena ämnen i avloppsvatten från reningsverk och industrier och förekomsten i olika delar av Sverige. Särskild vikt läggs vid vattendrag som mynnar i Östersjön. Vidare avser vi att påvisa eventuella skillnader i utsläpp av östrogena ämnen vid olika reningsmetodik för kommunala avloppsvatten. Undersökningens uppläggning framgår av principskissen på titelsidan.

2 Material och metoder

2.1 Östrogentest med modifierade jästceller

2.1.1 Vattenprovtagning, upparbetning

Avloppsvatten provtogs under fältförsöken med flödesproportionella dygnsprover som med lika delar blandades till treveckorsprov. I vissa mindre anläggningar blandades lika delar av tre flödesproportionella dygnsprover som uttagits en gång per vecka. Proverna förvarades frysta, förutom det dygn då dygnsprov insamlades, då provet hölls vid +4-8°C.

Vattenprov (500 ml) extraherades med 200 mg fastfaskolonner innehållande hydroxyle-rad polystyren-divinylbensen (ENV+, Sorbent AB, Västra Frölunda) enligt en publicerad procedur (12). Grövre partiklar i vattenproverna avskiljdes genom att låta provet passera en filterskiva av polyeten med en porstorlek av 20 µm kopplad i serie omedelbart före kolonnen.

2.1.2 Utförande

Test utfördes i mikrotiterplattor i huvudsak enligt en publicerad beskrivning (6). Varje platta innehöll en negativ kontroll med enbart odlingsmedium, en standard med östradiol och upp till sex enkelprover av extraherade avloppsvatten. Vid varje test inkuberas två sådana plattor (duplikat). Plattorna avlästes fotometriskt efter 3-4 dygn vid 570 nm. Ur standardkurvan för östradiol beräknades EC₅₀ som uttrycktes i ng/l. För av-

loppsvatten beräknades också EC_{50} fastän uttryckta i antal gånger spädning. Ur jämförelser med östradiol beräknades därefter effekten av avloppsvatten i östradiolekvivalenter och uttrycktes i ng/l.

2.2 Fiskförsök

2.2.1 Burexponering

Ej könsmogen regnbåge placerades i burar i vattendrag där avloppsvatten släpps ut. Fisken erhöles från närbelägna ur fiskhälsosynpunkt godkända leverantörer efter tillstånd från länsmyndigheter för varje provlokal.



Fig. 1 och 2 Transport och utsättning av regnbåge för test av östrogena effekter

Fiskens storlek har främst beroende av årstid varierat i intervallet 50-200 g. I 50 x 150 cm garnburar eller 80 l behållare av polyetenplast placerades 10-20 fiskar per lokal och 7-10 fiskar per bur. Antalet burar på varje plats bestämdes av fiskarnas antal och storlek. Burarna placerades i påverkansområdet för avloppsvattnet i närheten av utsläppspunkten på platser där också recipientens vilda fiskbestånd exponeras. Inga försök att beräkna utspädningen gjordes. Samtidigt placerades burar på en kontrolllokal uppströms i strömmande recipienter eller utanför det närmaste påverkansområdet i öppna recipienter. Genomförandet har godkänts av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (beslut C205-98).

Exponeringarna utfördes under september-november 1998 och maj-november 1999 med avbrott för vintermånaderna 1998-1999 och sommarperioden juli –början av augusti 1999. Vattentemperaturen under exponeringarna låg inom intervallet 12-20°C. Exponeringarna varade i 21 ± 1 dagar under samma period som akvarieexponeringen och vattenprovtagningen för screentestet.

2.2.2 Akvarieexponering

I vissa anläggningar exponerades regnbåge i akvarier med genomströmmande utspätt avloppsvatten. Ca 10 fiskar hölls i genomluftade 80 l glasakvarier. Avloppsvatten pumpades genom akvarierna med 0,5 – 1 l/min. I vissa anläggningar krävdes kylning av avloppsvattnet till under 20°C.

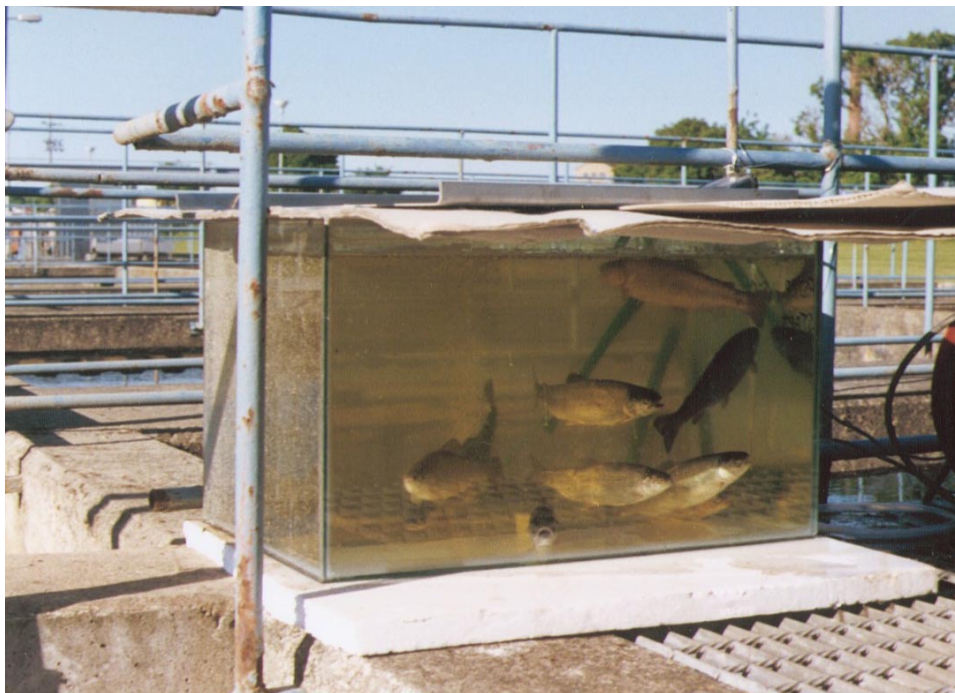


Fig. 3 Anordning för akvarieexponering av regnbåge vid ett av reningsverken.

2.2.3 Fiskprovtagning

Fiskarna transporterades till och från utsättningsplatserna i vattentankar med genomströmmande syrgas. Efter exponeringen togs fiskarna till lokala laboratorier. Blodprov togs med sprutor preparerade med heparin och trasylol samt centrifugerades vid ca 1000 rpm för beredning av plasma. Proverna frystes därefter in i flytande kväve och förvarades vid -80°C i väntan på analys.

Efter yttre besiktning av fisken, vägning och mätning, fripreparerades lever och gonader. Organen vägdes och fixerades därefter i buffrad formalin för histologisk undersökning.

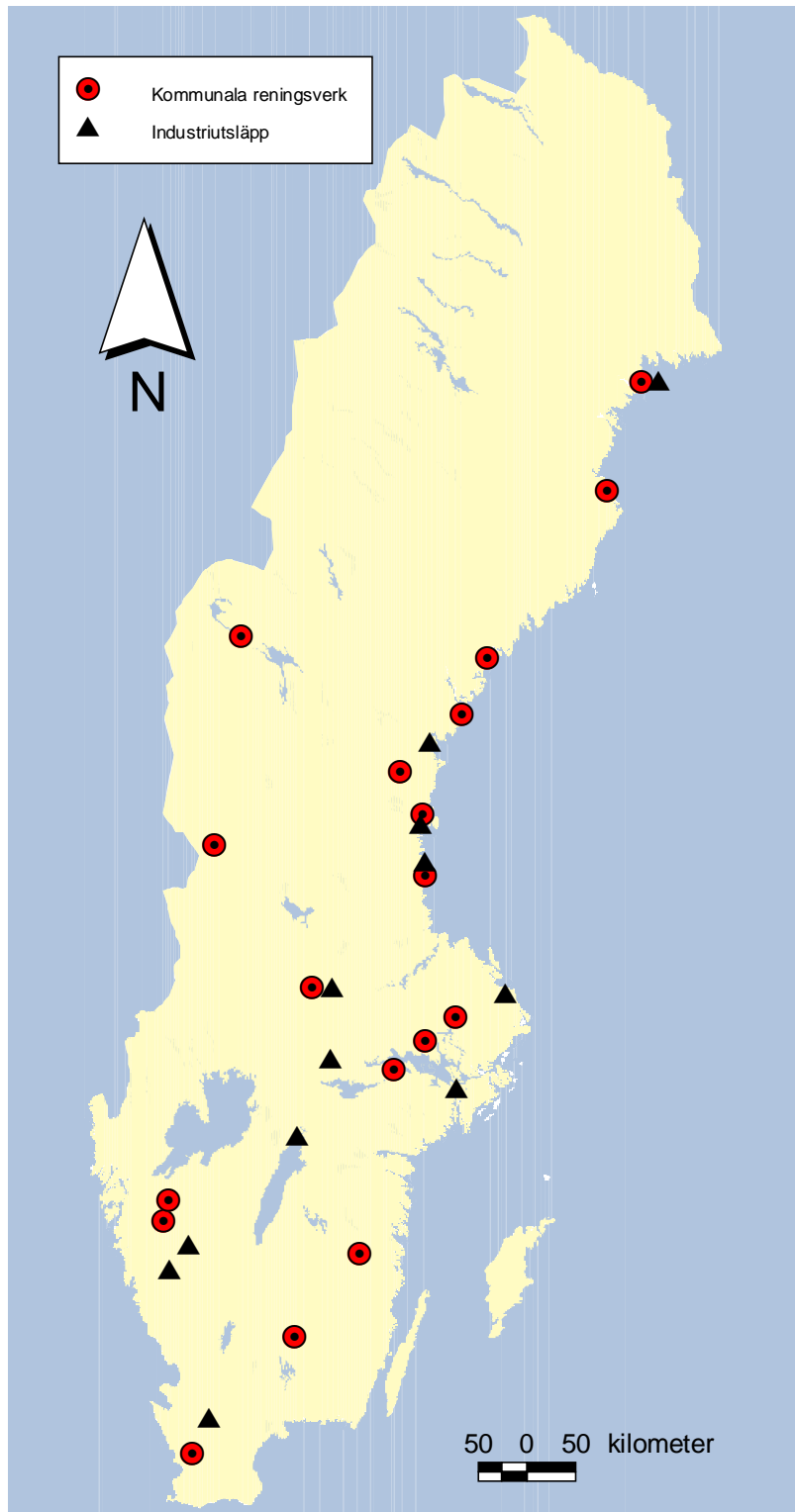
2.2.4 Analys av vitellogenin

Halter av vitellogenin i blodplasma från regnbåge analyserades med ELISA vid Zoofysiologiska avdelningen vid Göteborgs universitet (11,14). Vid analysen användes antikroppar mot vitellogenin från röding, vilka korsreagerar med vitellogenin från regnbåge. Resultaten anges i µg av proteinet per ml blodplasma.

3 Resultat och diskussion

3.1 Undersökta reningsverk och industrier

Provplatsernas geografiska läge framgår av kartan i Fig. 4. Undersökta kommunala och industriella anläggningar framgår av kartan, i övrigt har önskemål om konfidentialitet tillmötesgått. Av kartan framgår att Östersjön direkt eller indirekt är recipient till flertalet av avloppsvattnen. Huvudsaklig reningsmetodik i de kommunala reningsverken framgår av Bilaga 1.



3.4 Screen-test

Test av östrogena effekter med modifierade jästceller utfördes i mikrotiterplattor. Ett exempel på resultat visas i Fig. 5, där bildning av en rödfärgad produkt visar förekomst av östrogener.

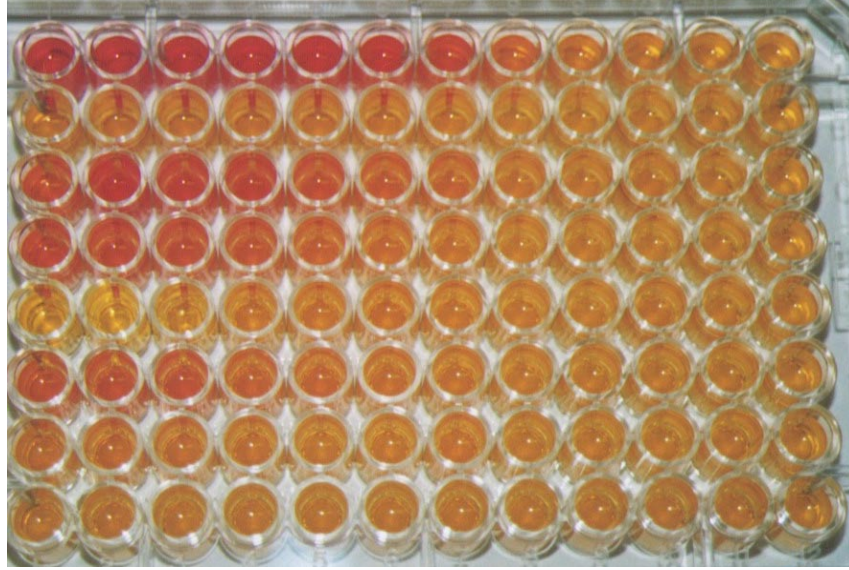


Fig. 5 Test av extrakt av avloppsvatten med jästcelltest. Varje rad utgör en koncentrationsserie av prov eller kontroller, i ordning uppifrån: östradiolstandard, blank, H2a inkommande, H2a utgående, kemiindustri 1, Ea inkommande, Ea utgående samt ytterligare en blank. Kodbeteckningar enligt Tabell 1, Bilaga 1.

3.4.1 Östrogen effekt i inkommande kommunala avloppsvatten

Obehandlat kommunalt avloppsvatten innehåller substanser som ger östrogena effekter i screentest. Effekterna motsvarade 1,1 – 31 ng/l (se Bilaga 1, Tabell 1). Vissa kommunala avloppsvatten innehöll ämnen som hämmade celltillväxten i testet, men trots detta har östrogena effekter kunnat påvisas vid större utspädning.

3.4.2 Östrogen effekt i behandlade, utgående kommunala och industriella avloppsvatten

Effekter av utgående kommunala avloppsvatten redovisas också i Tabell 1, Bilaga 1. Uppmätta effekter motsvarade halter av östradiol från <0,1 – 15 ng/l. Effekterna ligger i nivå med eller strax under vad som tidigare är känt från t. ex. Tyskland (2,5-25 ng östradiolekvivalenter/l) (12).

Avloppsvatten från sex massa- och pappersbruk representerande två olika typer av produktion, TMP och blekt sulfatmassa har undersökts avseende östrogena effekter. Som framgår av Bilaga 1, Tabell 2 kunde inga östrogena effekter påvisas i jästcelltestet. Avloppsvatten från ett stålverk (avloppsvatten från koksverk) gav heller inga effekter i testet. Tre kemiindustrier har ingått i undersökningen. Avloppsvatten från en av dessa innehöll en låg östrogen effekt motsvarande 0,6 ng östradiolekvivalenter/l. Prov av de två andra anläggningarna saknade östrogen effekt. Två textilindustrier har också undersökts. Dessa leder sitt avloppsvatten genom kommunala reningsverk och prover har därför insamlats i utgående vatten från dessa verk. Båda verken hade påvisbara östrogena effekter (Bilaga 1, Tabell 2), som dock inrymdes i intervallet för effekter från kommunala anläggningar. Effekterna kan helt eller åtminstone delvis hänföras till bidrag från hushållsavlopp.

3.4.3 Retention av östrogena effekter i kommunala reningsverk

Retentionen eller minskningen i östrogen effekt vid kommunal rening kan beräknas ur data från inkommande och utgående avloppsvatten. Resultaten ges i Fig. 6 och Tabell 1 i Bilaga 1. I de flesta fall erhöles en betydande minskning från 60-70% ända upp till nära 100%. Allra högst var retentionen i de två anläggningar som tillämpade kväverening, en med konventionell metodik, den andra med våtmarksrening. I dessa uteblev den östrogena effekten efter behandlingen. I fem anläggningar kunde ingen minskning av effekten påvisas. Tre av dessa tillämpade direktfällning (med aluminium- och järn(III)-salter). Iakttagelserna tyder på att den biologiska behandlingen har stor betydelse för retentionen av substanser med östrogena effekter i reningsverk. Upprepade fällningssteg har också lett till högre retention av ämnen med östrogena effekter. I tre fall upprepades vattenprovtagningen (E1a och b, F1a och b, H2a och b) och i två av dessa fall uteblev retentionen vid test i juni. Test i september året innan gav en påtaglig minskning i utgående vatten (81 resp. 94 %). De båda verken använde Al till efterfällning resp. simultanfällning. I den tredje anläggningen minskade också retentionen, från 47 till 33 %, men inte lika påtagligt som i de två förstnämnda. Resultaten visar att retentionen i ett och samma reningsverk kan variera högst betydligt.

I två verk ökade den östrogena effekten i utgående avloppsvatten jämfört med i inkommande vatten. Effekterna i inkommande vatten i de två anläggningarna där effekterna ökade var relativt låga, 1,6 resp. 3,0 ng/l. Inkommande avloppsvatten innehöll i andra verk motsvarande upp till 31 ng/l. Ofullständig dekonjugering eller östrogenhämmande effekter i inkommande avloppsvatten skulle kunna vara orsaker till ökad östrogen effekt i utgående avloppsvatten.

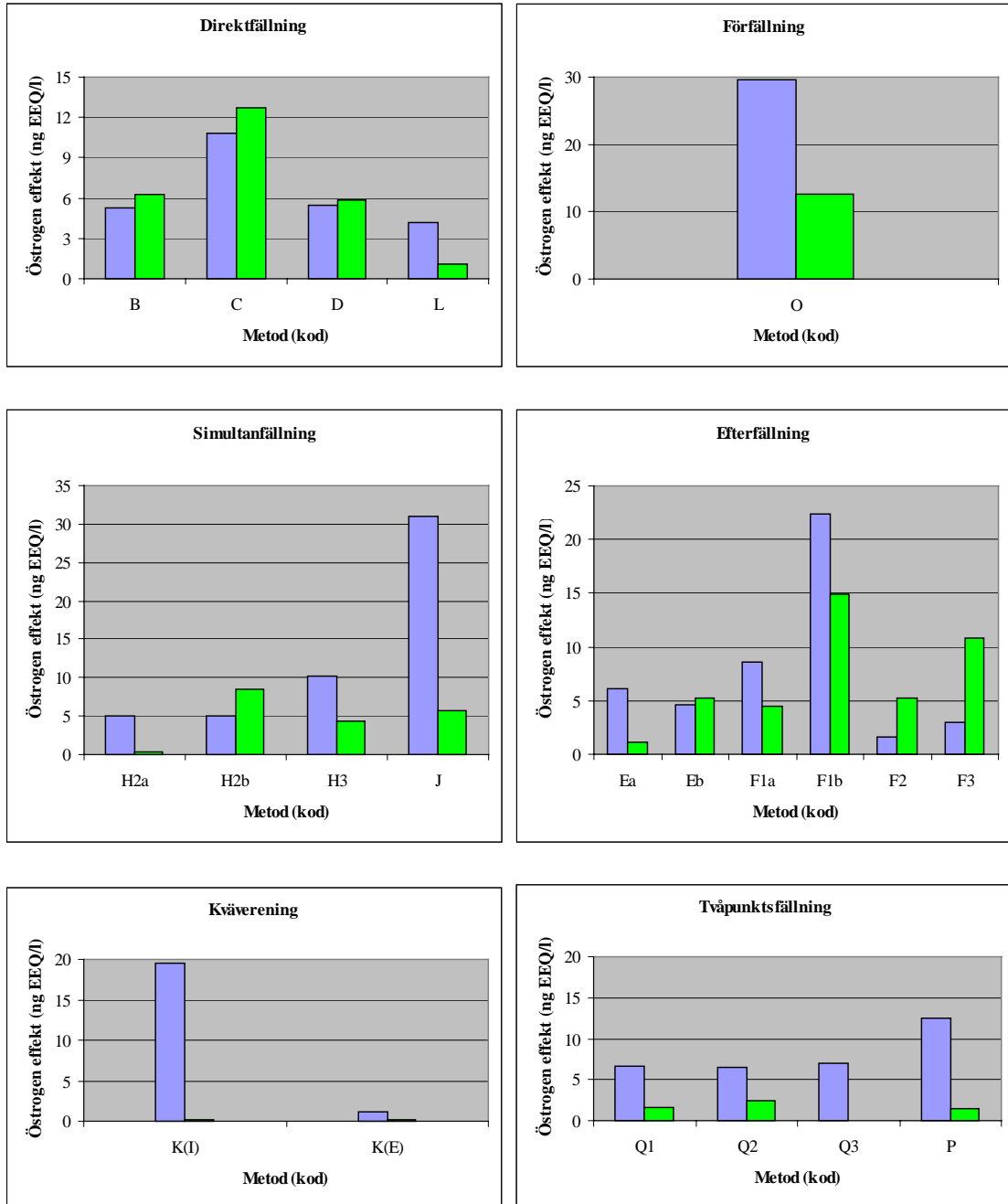


Fig. 6 Retention av östrogena effekter i reningsverk med olika reningsprocesser. Koder för reningsmetoder, se Tabell 1, Bilaga 1.

3.5 Östrogena effekter på fisk

Under den treveckorsperiod under vilken regnbåge hölls i burar och akvarier var överlevnaden i regel god. I enstaka fall förekom överdödlighet eller förluster av fisk och redskap. Denna relaterades t. ex. till förändringar i vattentemperatur, syrebrist, höga halter av ammoniak eller aluminium, predation och sabotage. Vid yttre besiktning av fisk före provtagning noterades i vissa fall nötskador på fenor och hud.

Vid den histologiska undersökningen av levervävnad kunde inga förändringar påvisas. Vad avser fiskarnas gonadvikter visade även dessa mätningar att all fisk som användes i studien var icke könsmogen. Relativa gonadvikter och levervikter i icke könsmogen regnbåge som exponerats i kommunala och industriella avloppsvatten redovisas i Fig. 1 i Bilaga 2. I de flesta undersökta avloppsvattnen förelåg ingen signifikant skillnad i dessa organvikter för exponerade fiskar jämfört med kontrollgrupper. I några fall erhöles en minskning av främst relativ levervikt, men eftersom denna inte heller var korrelerad med påvisade östrogena effekter (ökad vitellogenhalt) måste orsaken till en exponeringsrelaterad ändring sökas i andra faktorer. Levern har normalt ett ganska stort upplag av kolhydrater som används i fiskens metabolism. Vid en stresspåverkan, t ex vid kemikalieexponering, förhöjs leverns metabolism för att bryta ned dessa kroppsfremmande ämnen, varvid kolhydrater åtgår för processen.

3.5.1 Induktion av vitellogeninbildning

Resultaten av test av östrogena effekter på burhållen regnbåge redovisas i Tabell 3 och 4 i Bilaga 1. Resultat föreligger från undersökningar utförda vid 11 kommunala reningsverk och 12 industriella anläggningar, varav två dock var kombinerade kommunala och industriella. Två textilavloppsvatten undersöktes efter inblandning med kommunalt avloppsvatten. Alla 175 undersökta fiskar från kontrolllokaler utom en hade vitellogeninhalter i blodet understigande detektionsgränsen 400 ng/ml. I en individ, en juvenil hona i kontrollgrupperna påvisades 1100 ng/ml.

Placering av regnbåge i burar utanför utmynnande kommunala reningsanläggningar gav ingen induktion av vitellogeninbildning (Bilaga 1, Tabell 3). Med denna markör för östrogena effekter kunde således ingen effekt påvisas efter tre veckors exponering i recipientmiljö. Ej heller kunde någon effekt i form av induktion av vitellogenin påvisas i recipienter till industriella avlopp (Bilaga 1, Tabell 4). Tolv industriella utsläpp undersöktes, 6 massaindustrier, 3 kemiindustrier, 2 textilindustrier (med inblandat kommunalt avlopp) samt ett stålverk. Resultaten avviker från tidigare undersökningar av kommunala utsläpp i Storbritannien (3,4) och från ett svenskt reningsverk (11), där östrogena effekter klart påvisats med denna metodik. Sannolikt har utspädningen varit större vid de provplatser som ingått i denna undersökning jämfört med förhållandena i England och det tidigare undersökta svenska verket.

Motsvarande test av regnbåge i akvarier visade kraftigt förhöjda vitellogeninhalter vid exponering för utspätt kommunalt avloppsvatten från fyra av de undersökta reningsverken. Medelhalter upp till 3 mg vitellogenin/ml plasma erhöles. I tre av de undersökta verken inducerades ej vitellogeninbildningen. Variation i temperatur vid exponeringen i akvarier (se Bilaga 1, Tabell 3) kan inte själv förklara skillnaden i uppmätta effekter. Uppenbarligen förekom inga östrogena ämnen i haltnivåer som var tillräckliga för att öka halten av proteinet i blodplasman. Ingen avgörande skillnad i reningsprocesserna föreligger som kan förklara dessa skillnader. De fyra verken med östrogena effekter i sitt utgående vatten (behandlade med efterfällning med Al, simultanfällning med Fe(II) eller för- och efterfällning resp. simultan- och efterfällning med Fe(III)) var ej väsentligen annorlunda jämfört med de som saknade påvisbara effekter (simultan- eller efterfällning med Al eller Fe(III)). Även verket med kodbeteckningen Q2 saknade effekt i form av inducering av vitellogeninbildning vid test av utgående vatten, men detta avloppsvatten testades vid en utspädning av 1/10. En eventuell östrogen effekt i koncentrerat avloppsvatten kan ha uteblivit på grund av utspädningen. De två textilindustriella avloppsvattnen som undersöktes med exponering i akvarier visade östrogena effekter i form av ökade halter av vitellogenin i blodplasma hos regnbåge. Effekterna var jämförelsevis låga. Sannolikt beror effekten av östrogener med ursprung i kommunalt avloppsvatten.

Variationen i vitellogeninnivå hos undersökta regnbågar var, som framgår av spridningsmått, i vissa fall betydande. Svårförklarade såväl låga som höga avvikande värden förekom i enstaka fall i exponerade grupper.

Regnbåge som histologiskt könsbestämdes till honor uppvisade ingen signifikant skillnad i fråga om vitellogeninhalter när de jämfördes med regnbåge som könsbestämdes till antingen hanar eller juvenila. Slutsatsen av detta är att alla fiskar tillhör kategorin juvenila, d v s ingen fisk som användes i försöket var köns mogen. Förhöjda vitellogeninhalter som uppmättes får då anses föreligga utan samband till könet hos fisken.

Jämförelser mellan östrogena effekter i *in vitro*-test och i test med fisk visas i Tabell 1. Som framgår av tabellen föreligger ingen dosrelaterad korrelation mellan östrogena effekter som östradiolekvivalenter och induktion av vitellogeninbildning i regnbåge som exponerats för utspätt avloppsvatten i akvarier.

Tabell 1 Jämförelser mellan två tester av östrogena effekter, screentest med modifierade jästceller och bildning av vitellogenin i regnbåge vid exponering i akvarier.

Anläggning, kod/process	Jästcelltest (ng/l) M ± sd (n)	Vitellogenin-halt i plasma µg/ml, M ± sd (n)
E, efterfällning Al	6,1 ± 1,2 (2)	<0,4
F3, efterfällning Al	10,8 ± 0,9 (2)	175 ± 51,2 (9)
G, efterfällning Fe(III)	5,2 ± 0,2 (2)	<0,4
H3, simultanfällning Al	4,3 ± 0,2 (2)	0,36 ± 0,38 (6)
I, simultanfällning Fe(II)*	<0,1 (2)	18,6 ± 14,2 (7)
P, simultan- och efterfällning Fe(III)	1,4 ± 0,1 (2)	3140 ± 2470 (6)
Q1, för- och efterfällning Al	1,7 ± 0,0 (2)	88,7 ± 44,8 (4)
3, TMP-bruk	<0,1 (2)	<0,4
4, Sulfatmassabruk	<0,1 (2)	<0,4
10 Textilindustri via kommunalt verk	4,8 ± 0,2 (2)	7,65 ± 7,25 (8)
11 Textilindustri via kommunalt verk	2,9 ± 1,2 (2)	2,33 ± 1,88 (8)
12 Stålverk	<0,1 (2)	<0,4

* Vattenprov för screentest insamlat efter ytterligare ett reningssteg, våtmarksbehandling för kvävereduktion; akvariet placerat före detta steg.

Industriavlopp utan påvisbara östrogena effekter i jästcelltestet saknade också effekter i testet med fisk. Inget kommunalt verk med dessa låga effekter i jästcelltest prövades med regnbåge i akvarier (se fotnot Tabell 1). Övriga kommunala avloppsvatten varierade från 1,4 – 10,8 ng östradiolekvivalenter/l och av dessa hade sex förhöjda halter av vitellogenin vid test med regnbåge. Avloppsvattnen från tre av anläggningarna låg kvar på nivåer under detektionsgränsen 0,4 µg/l. En möjlig förklaring till den uteblivna korrelationen kan vara en variation i nivåer av östrogena ämnen med tiden. Vattenprovtagningen och *in vitro*-testet ger ett medelvärde för treveckorsperioden. Eventuellt kan tillfälligt höga halter ha förekommit av sådan varaktighet att de förmått inducera vitellogeninbildning hos regnbåge men ej nämnvärt påverkat medelvärdet som uppmäts för perioden. En annan faktor som skiljer de två sätten att testa är knuten till östrogenernas förekomstform. I screentestet avfiltreras grövre partiklar före extraktion av vattenprov, medan fisk exponeras för såväl östrogena ämnen i löst form och eventuellt partikelbunda ämnen. Den tredje och kanske viktigaste faktorn rör skillnader nedbrytbarhet i förekommande östrogena ämnen. Det är känt från tidigare undersökningar att etinylöstradiol på molär basis har starkare östrogen effekt i test med fisk än naturlig östradiol, medan substanserna har ungefär samma effekt i screentestet. Orsaken har angetts att naturligt östradiol metaboliseras snabbare än den syntetiska analogen. Variationer i proportioner mellan dessa ämnen i avloppsvatten skulle kunna vara upphov till variationen i testresultat.

4 Slutsatser

- Undersökningen har påvisat förekomst av östrogena effekter av kommunala avloppsvatten i Sverige. Undersökta industriella utsläpp gav inga eller endast låga nivåer av östrogena effekter.
- Vid de utspädningsförhållanden som rådde i recipienter till undersökta reningsverk uteblev de effekter på fisk som observerades vid exponering för outspätt avloppsvatten.
- Olika reningsprocesser har visat sig vara olika framgångsrika att reducera östrogena effekter. Biologisk behandling eller upprepad fällningsmetodik tycks vara av stor betydelse för minskningen.
- Screentest *in vitro* visade sig vara en känslig och tillförlitlig metod för östrogena effekter avloppsvatten. Som oftast vid användning av screenmetoder är det nödvändigt att jämföra och verifiera med test av relevanta testorganismer i en realistisk utsläppsmiljö.

5 Tillkännagivanden

Modifierade jästceller erhöles som gåva av John Sumpter, Brunel University, Uxbridge, England. Tack till Joakim Larsson för värdefulla synpunkter på ELISA-test av vitellogenin och kommentarer till manuskriptet. Under genomförandet av detta projekt har ett stort antal personer vid industrier, kommunala reningsverk och fiskodlingar medverkat. Vi vill rikta ett särskilt tack till Lena Olsson, Linda Karlsson och Gunnar Carlsson för ett tålmodigt arbete i samband fältförsöken. Finansiellt stöd till undersökningen har erhållits från Kemira Kemwater AB, SSVL, VA-Forsk, SIVL, enskilda industrier och kommuner samt projektet "Community programme of research on environmental hormones and endocrine disrupters (COMPREHEND)".

6 Referenser

- 1 J.P. Sumpter, S. Jobling & C.R. Tyler, 1996, Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. I "E.W. Taylor, Utg., Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches". Cambridge University Press, Cambridge, pp. 205-224.
- 2 J.P. Sumpter, 1995, Feminized responses in fish to environmental estrogens. Toxicol. Lett., 82, 737-742.

- 3 J.E. Harries, D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiesson, P. Neall, E. Routledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter & T. Tylor, 1996, A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1993-2002.
- 4 J.E. Harries, D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiesson, P. Neall, E. Routledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter & T. Tylor, 1997, Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Toxicol. Chem.*, 16, 534-542.
- 5 R.E. Ranney, 1977, Comparative metabolism of 17 α -ethynyl steroids used in oral contraceptives. *J. Toxicol. Environ. Health*, 3, 139-166.
- 6 E. Routledge & J.P. Sumpter, 1996, Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 241-248.
- 7 C.A. Harris, P. Henttu, M.G. Parker & J.P. Sumpter, 1997, The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Persp.*, 105, 802-811.
- 8 P. Mellanen, T. Petänen, J. Lehtimäki, S. Mäkelä, G. Bylund, B. Holmbom, E. Mannila, A. Oikari & R. Santti, 1996, Wood-derived estrogens: Studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 136, 381-388.
- 9 J.P. Sumpter & S. Jobling, 1995, Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.*, 103, 173-178.
- 10 J. Sherry, A. Gamble, P. Hodson, K. Solomon, B. Hock, A. Marx & P. Hansen, 1999. Vitellogenin induction in fish as an indicator of exposure to environmental estrogens. In "S.S. Rao, Utg., Impact assessment of hazardous aquatic contaminants. Concepts and approaches", Lewis Publishers, London, pp. 123-160.
- 11 D.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Petterson, A.H. Berg, P-E. Olsson & L. Förlin, 1999, Ethinylloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.*, 42, 91-97.
- 12 W. Körner, V. Hanf, W. Schuller, C. Kempter, J. Metzger & H. Hagenmaier, 1999, Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.*, 225, 33-48.

- 13 A. Johansson & A. Pettersson, 1999, Undersökning av östrogen i kommunalt avloppsvatten från reningsverket Sundet i Växjö. Examensarbete, Inst. teknik & naturvetenskap, Växjö universitet.
- 14 J. Parkkonen, D.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, M. Petterson, A.H. Berg, P-E. Olsson & L. Förlin, 1999. Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish. 6th Int. symp. on reproductive physiology of fish. Bergen, 1999, Proc., in press.

Tabell 1 Screentest av östrogena effekter i inkommande och utgående kommunalt avloppsvatten.

Kod	Reningsprocess	Prov-period	Inkommande avloppsvatten (ng östradiol-ekvivalenter/l)			Utgående avloppsvatten (ng östradiol-ekvivalenter/l)			Retention av östrogen effekt	
			n	M	±sd	n	M	±sd	%	Signifikans*
B	Direktfällning, Al	9910	2	5,2	0,9	2	6,3	1,0	-2	NS
C	Direktfällning, Al	9907	2	10,8	0,1	2	12,7	1,8	-18	NS
D	Direktfällning, Fe(III)	9906	2	5,4	1,2	2	5,9	0,3	-8	NS
L	Direktfällning, Kalk	9907	2	4,1	0,7	2	1,1	0,0	78	S
Ea	Efterfällning, Al	9809	2	6,1	0,2	2	1,2	0,0	81	S
Eb	Efterfällning, Al	9906	5	4,5	2,1	5	5,2	1,7	-14	NS
F1a	Efterfällning, Al	9906	2	8,6	1,1	2	4,5	0,1	47	S
F1b	Efterfällning, Al	9910	2	22,3	2,5	2	14,9	2,2	33	S
F3	Efterfällning, Al	9908	2	3,0	0,2	2	10,8	0,9	-257	I
G	Efterfällning, Fe(III)	9906	2	1,6	0,8	2	5,2	0,2	-223	I
H2a	Simultanfällning, Al	9809	2	5,0	0,6	2	0,3	0,3	94	S
H2b	Simultanfällning, Al	9906	5	5,0	2,5	5	8,6	5,1	-72	NS
H3	Simultanfällning, Al	9906	2	10,2	0,1	2	4,3	0,1	58	S
J	Simultanfällning, Fe(III)	9810	2	31	3,4	2	5,7	1,2	82	S
K(E)	Efterfällning, Al, kväverening	9906	2	1,1	0,3	2	<0,1		>91	S
K(I)	Simultanfällning, Fe(II), våtmarksrening	9908	2	19,5	2,3	2	<0,1		>99	S
O	Förfällning, Fe(III)	9909	2	29,6	0,9	2	12,6	3,3	57	S
P	Simultan- och efterfällning, Fe(III)	9810	2	12,5	0,5	2	1,4	0,1	89	S
Q1	För- och efterfällning, Al	9909	2	6,7	1,7	2	1,7	0,0	75	S
Q2	För- och efterfällning, Al	9904	2	6,5	0,1	2	2,4	0,1	63	S
Q3	För- och efterfällning, Al	9809	2	6,9	1,2	2	0,08	0,06	99	S

* S = signifikant minskade effekter mellan inkommande och utgående avloppsvatten ($p < 0,05$), NS = ej signifikant, I = signifikant ökning ($p < 0,05$).

Tabell 2 Screentest av östrogena effekter i industriavloppsvatten.

Kod	Industri, produktion	Prov-period	Utgående avloppsvatten (ng östradiol-ekvivalenter/l)		
			n	M	±sd
1	TMP-bruk, 1	9908	2	<0,1*	
2	TMP-bruk, 2	9909	2	<1,6	
3	TMP-bruk, 3	9906	2	<0,4	
4	Sulfatmassabruk 1	9908	2	<0,1	
5	Sulfatmassabruk 2	9908	2	<6,4	
6	Sulfatmassabruk 3	9906	2	<0,8	
7	Kemiindustri 1	9809	2	0,6	0,2
8	Kemiindustri 2	9906	2	<0,8	
9	Kemiindustri 3	9911	2	<0,1	
10	Textil/kommunal 1	9906	2	4,8	0,2
11	Textil/kommunal 2	9906	2	2,9	1,2
12	Stålverk	9909	2	<0,8	

* varierande detektionsgränser beroende på hämmad celltillväxt i test med höga provkoncentrationer.

Tabell 3 Vitellogeninbildning i regnbåge vid exponering för kommunala avloppsvatten.

Kod, reningsprocess	Vitellogenin i regnbåge ($\mu\text{g/ml}$ plasma)									
	Kontroll			Exponerade			Exponerade i akvarier (100% avloppsvatten)			
	n	M	$\pm\text{sd}$	n	M	$\pm\text{sd}$	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	n	M	$\pm\text{sd}$
Eb: Efterfällning Al	2	<0,4*			e.a.**		15	7	<0,4	
F3: Efterfällning Al	5	0,23	0,51	3	<0,4		16	9	175	51,2
G: Efterfällning Fe(III)		e.a.			e.a.		12	1	<0,4	
H2a: Simultanfällning Al	11	<0,4		1	<0,4				e.u.	
H2b: Simultanfällning Al	8	<0,4		9	<0,4			0	e.a.	
H3: Simultanfällning Al	6	<0,4		6	<0,4		13-18	6	0,36	0,38
I: Simultanfällning Fe(II)	5	<0,4			e.a.		18-19	7	18,6	14,2
J: Simultanfällning Fe(III)	10	<0,4		9	<0,4				e.u.	
K (E): Efterfällning Al, kvävereduktion	7	<0,4		9	<0,4				e.a.	
Pa: Simultan- och efterfällning Fe(III)	9	<0,4		9	<0,4		14	6	3140	2470
Pb: Simultan- och efterfällning Fe(III)	10	<0,4		13	<0,4				e.u.	
Q1: För- och efterfällning Fe(III)	11	<0,4			e.u.		16-15	4	88,7	44,8
Q2: För- och efterfällning Fe(III)***	3	<0,4			e.u.			3	<0,4	

* Detektionsgräns för vitellogeninanalys 0,4 $\mu\text{g/ml}$ blodplasma.

** e.u. = ej undersökt, e.a. = ej analyserad: fiskförluster på grund av predation, sabotage etc.

*** Exponering för 10 % avloppsvatten (13).

Tabell 4 Vitellogeninbildning i regnbåge vid exponering för industriella avloppsvatten.

Kod, reningsprocess		Vitellogenin i regnbåge ($\mu\text{g/ml}$ plasma)								
		Kontroll			Exponerade			Exponerade i akvarier (100% avloppsvatten)		
		n	M	$\pm\text{sd}$	n	M	$\pm\text{sd}$	n	M	$\pm\text{sd}$
1	TMP-bruk, 1	5	<0,4*		7	<0,4			e.a.**	
2	TMP-bruk, 2	16	<0,4		16	<0,4			e.a.	
3	TMP-bruk, 3	9	<0,4		10	<0,4		8	<0,4	
4	Sulfatmassabruk 1	5	<0,4		2	<0,4		3	<0,4	
5	Sulfatmassabruk 2	1	<0,4		7	<0,4			e.u.	
6	Sulfatmassabruk 3	6	<0,4		7	<0,4			e.u.	
7	Kemiindustri 1	2	<0,4		9	<0,4			e.u.	
8	Kemiindustri 2	8	<0,4		9	<0,4			e.a.	
9	Kemiindustri 3	18	<0,4		13	<0,4			e.a.	
10	Textil/kommunal 1	6	<0,4			e.a.		8	7,65	7,25
11	Textil/kommunal 2	4	<0,4		3	<0,4		8	2,33	1,88
12	Stålverk	11	<0,4		9	<0,4		7	<0,4	

* Detektionsgräns för vitellogeninanalys 0,4 $\mu\text{g/ml}$ blodplasma.

** e.u. = ej undersökt, e.a. = ej analyserad: fiskförluster på grund av predation, sabotage etc.

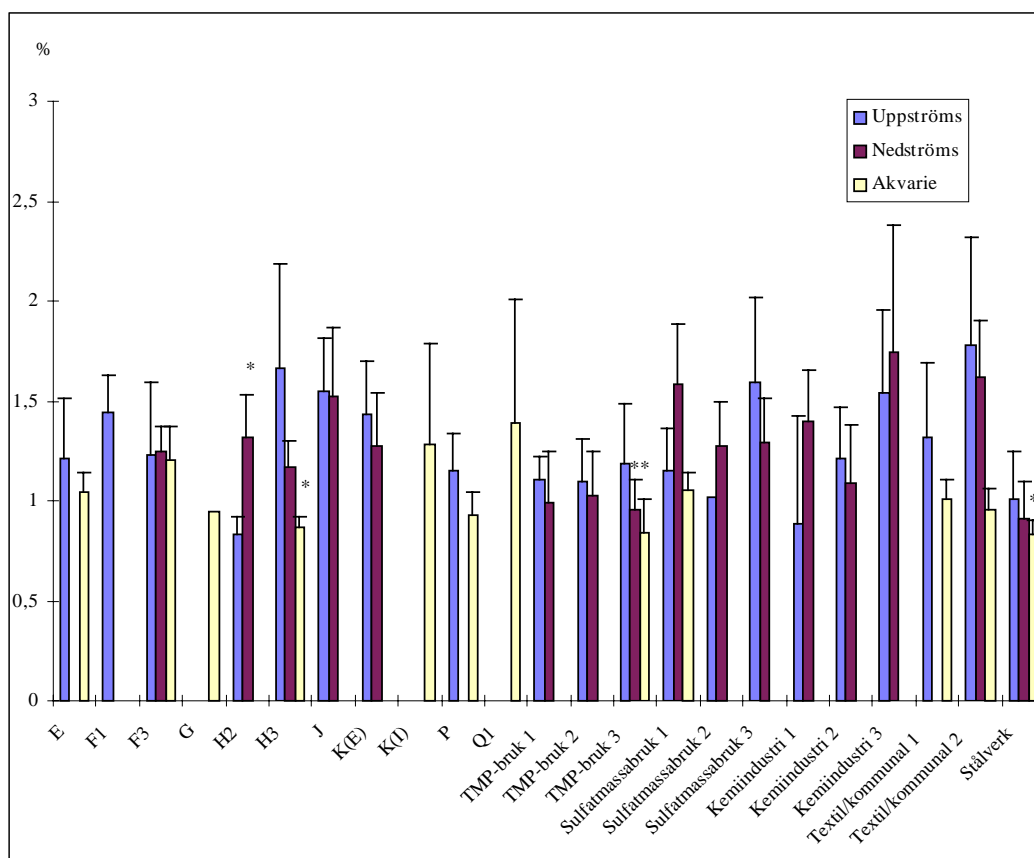
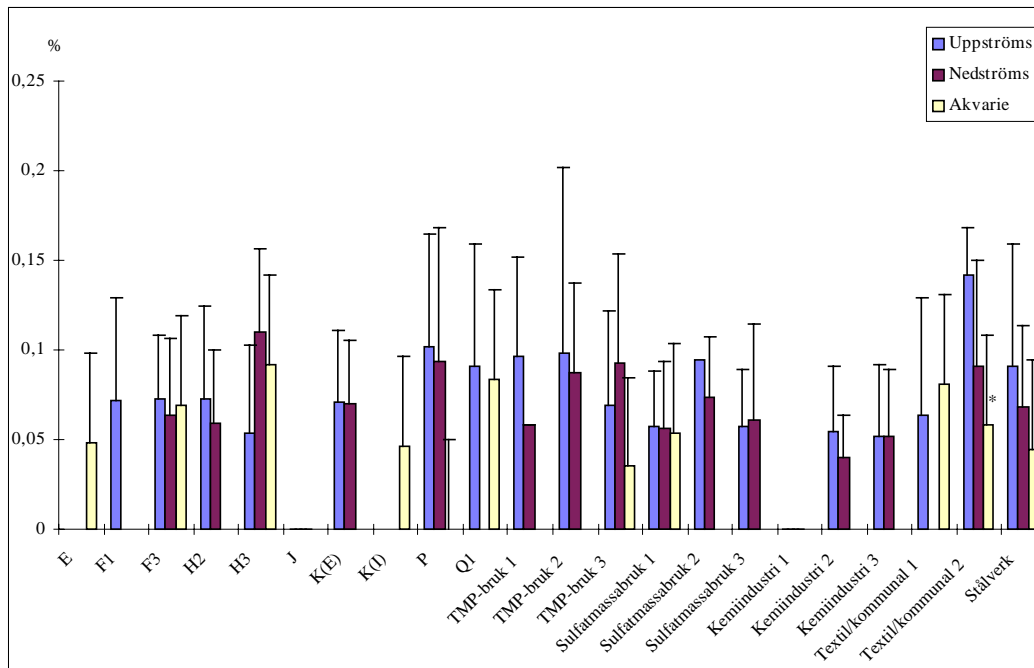


Fig. 1 Relativa gonadvikter (övre diagrammet) och levervikter (nedre diagrammet) i icke könsmogen regnbåge exponerad för kommunala och industriella avloppsvatten. * anger signifikanta skillnader ($p < 0,05$)

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

IVL är ett oberoende och fristående forskningsinstitut som ägs av staten och näringslivet. Vi erbjuder en helhetssyn, objektivitet och tvärvetenskap för sammansatta miljöfrågor och är en trovärdig partner i miljöarbetet.

IVLs mål är att ta fram vetenskapligt baserade beslutsunderlag åt näringsliv och myndigheter i deras arbete för ett bärkraftigt samhälle.

IVLs affärsidé är att genom forskning och uppdrag snabbt förse samhället med ny kunskap i arbetet för en bättre miljö.

Forsknings- och utvecklingsprojekt publiceras i

IVL Rapport: IVLs publikationsserie (B-serie).

IVL Nyheter: Nyheter om pågående projekt på den nationella och internationella marknaden.

IVL Fakta: Referat av forskningsrapporter och projekt.

IVLs hemsida: www.ivl.se

Forskning och utveckling som publiceras utanför IVLs publikationsserie registreras i IVLs A-serie.

Resultat redovisas även vid seminarier, föreläsningar och konferenser.



IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Box 210 60, SE-100 31 Stockholm
Hälsingegatan 43, Stockholm
Tel: +46 8 598 563 00
Fax: +46 8 598 563 90

IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd

Box 470 86, SE-402 58 Göteborg
Dagjämningsgatan 1, Göteborg
Tel: +46 31 725 62 00
Fax: +46 31 725 62 90

Aneboda, SE-360 30 Lammhult
Aneboda, Lammhult
Tel: +46 472 26 20 75
Fax: +46 472 26 20 04